

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal



TESIS DOCTORAL

**Asimilación del nitrógeno en *Citrullus vulgaris* L. : variedad
comercial reina durante los periodos de germinación oscura
y enverdecimiento**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María del Pilar González Bravo

Madrid, 2015

María del Pilar González Bravo

TP
1981
145



* 5 3 0 9 8 5 6 1 6 7 *
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

x-53-01116-6

ASIMILACION DEL NITROGENO EN CITRULLUS VULGARIS L. VARIEDAD
COMERCIAL REINA DURANTE LOS PERIODOS DE GERMINACION OSCURA
Y ENVERDECIMIENTO.

Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Complutense de Madrid
1981



BIBLIOTECA

© María Pilar González Bravo
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1981
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-15929-1981

MARIA DEL PILAR GONZALEZ BRAVO

**"ASIMILACION DEL NITROGENO EN CITRULLUS VULGARIS L.
VARIEDAD COMERCIAL REINA DURANTE LOS PERIODOS DE
GERMINACION OSCURA Y ENVERDECIMIENTO".**

Director: Dra. Dña. Rosalía Ramirez Vera,
Profa. Adjunta de la Cátedra de
Fisiología Vegetal de la Facultad
de Biología de la Universidad Complutense de Madrid.

Ponente: Prof. Dr. Don Carlos Vicente Córdoba,
Catedrático de Fisiología Vegetal de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
CATEDRA DE FIOLOGIA VEGETAL
FACULTAD DE BIOLOGIA
MADRID 1980

-i-

**A mis padres con todo mi cariño y
agradecimiento.**

El presente trabajo ha sido realizado en la Cátedra de Fisiología Vegetal de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid, gracias a una Beca de Formación del Personal Investigador (Ministerio de Universidades), bajo la dirección de la Profa. Dra Dña Rosalía Ramirez Vera sin cuya ayuda no hubiera podido ser realizado. Así mismo deseo expresar mi agradecimiento a la Profa. Dña. Milagros Maeso Carbonell por su constante ayuda y dedicación. De igual manera deseo agradecer al Prof. Dr Don Carlos Vicente Córdoba su asesoramiento y ponencia del presente trabajo, y a todos mis compañeros de laboratorio.

ABREVIATURAS:

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
ATP: Adenosintrifosfato
EDTA: Acido etilendiamino tetracético
Tris: Tris- (hidroximetil)-aminometano
TCA: Acido tricloroacético

INDICE

<u>CONTENIDO</u>	<u>PAGINA</u>
1.- INTRODUCCION	1
1.1.- Asimilación del nitrógeno	1
1.1.1.- Glutamato deshidrogenasa: Características.	5
1.1.2.- Glutamina sintetasa: Características.	7
1.2.- Regulación de los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa y glutamina sintetasa por la fuente nitrogenada.	9
1.3.- Influencia de la luz	12
2.- MATERIALES Y METODOS	15
2.1.- Organismo utilizado y condiciones de cultivo.	15
2.2.- Condiciones de iluminación	16
2.3.- Obtención del extracto libre de células	16
2.4.- Determinación de la actividad glutamato deshidrogenasa	16
2.5.- Determinación de la actividad glutamina sintetasa.	17
2.6.- Determinación de la cantidad de proteínas.	18
2.7.- Electroforesis del enzima glutamato deshidrogenasa.	18
2.8.- Utilización de inhibidores de síntesis de proteínas.	18
3.- RESULTADOS	20
3.1.- Control de los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa en plántulas crecidas en oscuridad continua dependiendo de la fuente nitrogenada del medio de incubación.	20
3.1.1.- Acción de los nitratos sobre los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa.	20
3.1.2.- Influencia del amonio sobre los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa.	23
3.2.- Control de los niveles de actividad glutamina sintetasa en plántulas crecidas en oscuridad continua dependiendo de la fuente nitrogenada del medio de incubación.	28

PAGINA

3.2.1.- Influencia de los nitratos sobre los niveles de actividad glutamina sintetasa.	31
3.2.2.- Acción del amonio sobre los niveles de actividad glutamina sintetasa.	31
3.3.- Influencia de la luz sobre los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa.	36
3.3.1.- Efecto de la luz sobre los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa de plántulas crecidas sobre nitratos.	36
3.3.2.- Efecto de la luz sobre los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa de plántulas crecidas sobre amonio.	49
3.4.- Influencia de la luz sobre los niveles de actividad glutamina sintetasa.	61
3.4.1.- Efecto de la luz sobre los niveles de actividad glutamina sintetasa de plántulas crecidas sobre nitratos.	66
3.4.2.- Efecto de la luz sobre los niveles de actividad glutamina sintetasa de plántulas crecidas sobre amonio.	71
3.5.- Electroforesis del enzima glutamato deshidrogenasa.	78
3.6.- Influencia de inhibidores de síntesis de proteínas sobre los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa y glutamina sintetasa.	86
4.- DISCUSION.	89
4.1.- Efecto de la fuente nitrogenada, nitrato o amonio, sobre los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa y glutamina sintetasa.	89
4.2.- Regulación de las actividades glutamato deshidrogenasa y glutamina sintetasa en función de la concentración de la fuente nitrogenada.	91
4.3.- Efecto de la interacción luz-fuente nitrogenada sobre los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa y glutamina sintetasa.	96

-vi-

PAGINA

5.- CONCLUSIONES.	103
6.- BIBLIOGRAFIA.	105

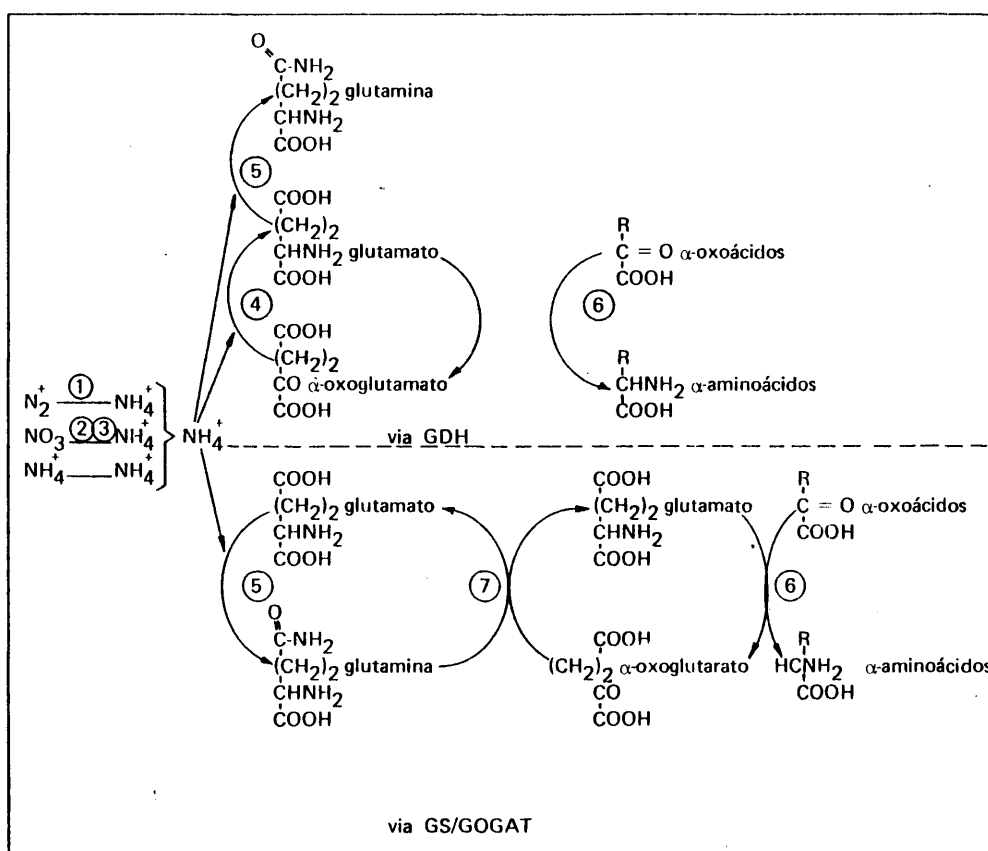
INTRODUCCION

1.1.- Asimilación del nitrógeno.

Durante el crecimiento y desarrollo de la plántula es necesaria una incorporación constante del nitrógeno del medio externo. En plantas superiores, la vía de asimilación del nitrógeno inorgánico, en forma de nitratos, hasta amoníaco, se inicia con la nitrato reductasa seguida por la nitrito reductasa (SCHRADER, 1977). El NH_4^+ es la última forma de nitrógeno inorgánico anterior a su incorporación en forma orgánica. Su reducción posterior para entrar en combinación orgánica, como grupo α -amino para formar los aminoácidos, es uno de los puntos más conflictivos en la actualidad, tanto en lo referente a las rutas enzimáticas implicadas como en los procesos de regulación a que están sometidos (BRYAN, 1976).

Tradicionalmente, en plantas superiores, se ha considerado como ruta mayoritaria y principal vía de asimilación la aminación reductora del 2-cetoglutarato, reacción catalizada por la glutamato deshidrogenasa (LEECH et al, 1970; GIVAN et al, 1970; GIVAN et al, 1971; LEA et al, 1972; MAGALHAEAS et al, 1974, entre otros autores).

Aunque se conocía la existencia de la -- glutamina sintetasa, en plantas superiores, no se había considerado su importancia en la asimilación directa del nitrógeno amónico, puesto que la incorporación se realizaba en forma amida y no como nitrógeno amino. Sin embargo, en 1970, TEMPEST, MEERS y BROWN describieron un nuevo enzima en Aerobacter aerogenes, capaz de catalizar la transferencia del nitrógeno en forma amida de la glutamina al 2-cetoglutarato, originando dos moléculas de glutamato. El enzima bacteriano es una proteína con hierro y azufre, que utiliza NADH ó NADPH como cofactores (MILLER, 1973). Este enzima se denominó 2-cetoglutarato aminotransferasa (oxidoreductasa-NADP) más comúnmente glutamato sintasa ó GOGAT. Los primeros intentos de localizarla en plantas superiores no tuvieron éxito; sin embargo, en 1974, DOUGALL describió una GOGAT dependiente de piridín nucleotido (E.C.2.6.1.13) en células en suspensión de zanahoria (Daucus carota L.), y en el mismo año, LEA y MIFLIN encontraron una GOGAT dependiente de ferredoxina reducida (E.C.1.4.7.1.) en cloroplastos de hojas de guisante -



Rutas de asimilación del nitrógeno, vías GDH y GS/GOGAT. Enzimas:

- ① Nitrogenasa. ②. Nitrato reductasa.
- ③ Nitrito reductasa. ④. Glutamato deshidrogenasa. ⑤. Glutamina sintetasa.
- ⑥ Transaminasa. ⑦. Glutamato sintetasa.

(Pisum sativum L.). Posteriormente se ha localizado en algas (LEA y MIFLIN, 1975), como Caulerpa simpliciuscula (MCKENZIE et al, 1979); así mismo se ha localizado en levaduras y hongos, aunque en muy pequeña proporción (BROWN et al, 1974; -- JOHNSON et al, 1974), y en gran variedad de plantas superiores como en semillas de Lupinus albus (LEA y FOWDEN, 1976), - en células de hojas de Zea mays (RATHMAN et al, 1976), en nódulos de raíces de Lupinus sp (BOLAND et al, 1977), en células en suspensión de Acer pseudoplatanus (FOWLER et al, 1979), en endospermos de maíz (OAKS et al, 1979; SODEK et al, 1979), en nódulos de raíces de Phaseolus vulgaris (AWONAIKE et al, - 1979), en células en suspensión de Glycine max (CHIU et al, - 1979) y en Digitaria sanguinalis (MOORE et al, 1979) entre -- otros muchos.

La existencia de este enzima junto con la glutamina sintetasa (E.C.6.3.1.2.) capaz de asimilar NH_4^+ en forma amida, actuando el glutamato como aceptor, fue propuesta en 1974 por LEA y MIFLIN como ruta alternativa en la síntesis neta de glutamato a partir de NH_4^+ y 2-cetoglutarato. A partir de entonces, los estudios realizados tienden a postularla como ruta principal en la asimilación directa del nitrógeno amónico. No obstante, junto a estas dos vías de incorporación se han descrito otras tales como formación de -- amidas del aspartato, aminación directa del fumarato y síntesis de carbamil fosfato, entre otros. Los enzimas responsables de estas reacciones se han descrito en distintas plantas superiores, como la asparaguina sintetasa en Lupinus luteus (ROGNES, 1975) y en soja (STREETER, 1973), pero en general - no contribuyen de igual manera en la asimilación del NH_4^+ - - puesto que en muy escasos tejidos las actividades de estos - enzimas, alanina y aspartato deshidrogenasas, entre otros, - son comparables a los encontrados para la glutamato deshidrogenasa y glutamina sintetasa, consideradas ambas como los enzimas responsables de la mayor parte de la asimilación (BRYAN, 1976).

En el momento actual, no existe uniformidad de criterio sobre la existencia de una única ruta dominante de asimilación. Hay suficiente base bibliográfica que soporta la vía glutamato deshidrogenasa como mayoritaria en la asimilación del nitrógeno, al igual que la que apoya la vía

glutamina/glutamato sintasa como principal. En este sentido, LEWIS y PATE, en 1973, observaron que al suministrar $^{15}\text{NO}_3^-$ a plantas de Pisum sativum, el nitrógeno marcado aparecía - tanto en el nitrógeno en forma amida de la glutamina como - en el nitrógeno amino del glutamato; paralelamente, las cinéticas de incorporación de $^{15}\text{NO}_3^-$ y $^{15}\text{NH}_4^+$ observadas en raíces de arroz (Oryza sativa) por YONEYAMA y KUMAZAWA (1974, - 1975), en Hordeum vulgare por OJI e IZAWA (1971), en algas verde azuladas por THOMAS y colaboradores (1975), en Anabaena cylindrica por WOLK (1976), en hojas de Datura stramonium L. por LEWIS y colaboradores (1975, 1979) y en Oryza sativa por MUHAMMAD (1974), entre otros, parecen demostrar que la incorporación del marcaje se realizaba en primer lugar en - el nitrógeno en forma amida de la glutamina, lo cual apoyaría la importancia de la ruta GS/GOGAT como mayoritaria en el proceso de asimilación. Conclusiones también obtenidas de - los estudios realizados utilizando inhibidores específicos de la glutamina sintetasa, como metionina sulfoximina (MIFLIN y LEA, 1975) que no afecta en absoluto a la enzima glutamato - deshidrogenasa y sí a la glutamina sintetasa y ligeramente a la GOGAT (BUCHANAN, 1975), como se ha comprobado en algas verde azuladas por STEWART y ROWELL (1975) y en Vicia faba L. por JORDAN y colaboradores en 1979; así como del empleo de - azaserina y 6-diazo-5-oxo-L-norvalina, ambos inhibidores de la glutamato sintasa (LEA y NORRIS, 1975).

Por otra parte, FOLKES y SIMS, en 1974 - observaron que al suministrar nitrógeno marcado a cultivos de Candida utilis este se incorporaba inicialmente y en mayor grado en el glutamato, dato concordante con lo encontrado por SENIOR en 1975 en Escherichia coli; por BURN y colaboradores (1973) en distintas especies de Schizosaccharomyces, y por SCKOKUT y colaboradores en 1979 en células en suspensión de Nicotiana tabacum L., resultados que apoyan la ruta glutamato deshidrogenasa como vía mayoritaria.

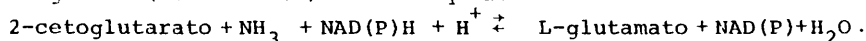
Aún así, los estudios comparados de ambas actividades enzimáticas, glutamato deshidrogenasa y glutamina sintetasa, son escasos en la bibliografía. En este sentido, DUKE y colaboradores en 1976 y 1978 en plantas de Glyci-

ne max (L) Merr. y en Zea mays L. observaron una relación recíproca entre ambas, al estudiar sus niveles de actividad, - similar a lo encontrado por NICKLISCH y colaboradores en 1976, y por BAUER en 1977 en hojas de Pisum sativum y por MOHANTY - y colaboradores en 1980 en células en suspensión de rosa.

En el momento actual, se puede considerar - que los sistemas de asimilación del nitrógeno a través de la glutamato deshidrogenasa y glutamina sintetasa, en las plantas superiores, son comparables a los descritos para bacterias (BEEVERS, 1977).

1.1.1.- Glutamato deshidrogenasa: Características.

La síntesis de glutamato a partir de NH_4^+ y 2-cetoglutarato, reacción catalizada por la glutamato deshidrogenasa (E.C.1.4.1.3) es en esquema:



Es un enzima reversible. En bacterias se - ha postulado la existencia de un sentido anabólico, en caso - de la reacción aminante, y otro catabólico en el caso de llevarse a cabo la reacción desaminante; no obstante, en plantas superiores la glutamato deshidrogenasa actúa principalmente - en dirección aminante, y parece ser que exclusivamente en el sentido desaminante en condiciones de elevada concentración de NH_4^+ (BROWN et al, 1979).

El enzima glutamato deshidrogenasa es un enzima alostérico de regulación muy compleja (DI PRISCO, 1975), cuya actividad se ve afectada por nucleótidos de adenina (DUBOIS et al, 1974). En 1980, STONE y colaboradores han sugerido un orden de unión entre los distintos sustratos y el enzima, al contrario de lo deducido por GROAT (1977) y GARLAND (1977) que no apoyan un orden determinado en la secuencia de unión. Por otra parte, STEVENSON y colaboradores (1971) consideran como sustrato principal de la reacción el NH_4^+ , mientras que PAHLICH (1975) sugiere como central al 2-cetoglutarato.

La especificidad de cofactor de la glutamato deshidrogenasa es objeto de discusión. En muchas bacterias y hongos, como *Saccharomyces cerevisiae* (ROON et al, - 1973) aparecen dos enzimas genéticamente distintos: uno cata-

bólico, específico de NAD y otro anabólico con especificidad por NADP. De manera similar, SIMS y colaboradores (1968) han sugerido en plantas superiores la existencia de dos enzimas independientes, uno ligado a NADH y otro que utiliza NADPH - como cofactor, al igual que lo propuesto por YAKOLEVA y colaboradores (1966). Por el contrario, PAHLICH y JOY, en 1971, han sugerido, al igual que hiciera BONE en 1959, un único enzima que funcionaría tanto con NADH como con NADPH como cofactores. Paralelamente, en 1960 YUE ha encontrado en endospermos de maiz y en cotiledones de Cicer arietinum L. modelos isoenzimáticos de la glutamato deshidrogenasa capaces de utilizar ambos coenzimas. Por otra parte, DAVIES y TEIXEIRA (1975) han sugerido un control del metabolismo del glutamato, regulado por el pool de piridín nucleótidos, más concretamente - por la relación NADH/NAD similar a lo propuesto por EHMKE y colaboradores en plantas de Lemna minor L. (1976, 1979).

La transición entre la forma activa y la inactiva se lleva a cabo entre límites muy precisos de pH, - presentando la misma estructura hexamérica en cada una de las dos formas (BARRY et al, 1974). Los procesos de activación e inactivación vienen regulados igualmente por el pH. El pH óptimo encontrado oscila entre 7,5 y 8,5 (BULEN, 1976).

El peso molecular de la glutamato deshidrogenasa aislada de raíces de Pisum sativum es 208000 ± 10000 (PAHLICH y JOY, 1971) similar al encontrado en otras plantas superiores y ligeramente inferior al determinado en bacterias, del orden de 250000 en Escherichia coli (VERONESE, 1975). El tratamiento con EDTA hace decrecer la actividad del enzima, - lo que indicaría que se trata de una metaloenzima que se reactiva por adición de Mn^{+2} , Zn^{+2} ó Ca^{+2} (YAMASAKI et al, 1969).

Se trata de un enzima termoestable que resiste temperaturas de hasta 60°C sin pérdida apreciable de actividad (PAHLICH y JOY 1971).

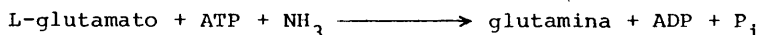
Los valores de K_m para el NH_4^+ varían dependiendo de la especie en estudio. Así, GARLAND y DENNIS (1977) han encontrado un valor de K_m que oscila entre 20 y 68 mM para el enzima purificado de mitocondrias de Pisum sativum, L.; LEA y THURMAN en 1972 han obtenido una K_m de $1,6 \times 10^{-3}$ M en mitocon

drias de Lactuca sativa L, y $5,80 \times 10^{-3} M$ en cloroplastos de la misma especie; oscilando por lo general entre 10 y 50 mM para gran número de plantas superiores. En 1977, MIFLIN y - LEA han sugerido que la baja afinidad de la glutamato deshidrogenasa por el NH_4^+ haría poco probable que este enzima - funcionara en condiciones de disponibilidad de nitrógeno -- amónico normales.

Los estudios sobre localización de la glutamato deshidrogenasa a nivel organular, dentro de una misma especie son muy escasos, a pesar que existen estudios realizados individualmente en los distintos órganos. Así, se han estudiado los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa en hojas de Zea mays L. y Setaria faberii (RITENOIR et al, 1967), en nódulos de Glycine max (SOULEN y OLSON, 1969; DUNN et al, 1973; BROWN y DILWORTH, 1971), en cotiledones de calabaza (Cucurbita pepo L.) (CHOU et al, 1972), en raíces de -- arroz (Oryza sativa L.) (KANAMORI et al, 1972), en raíces - Pisum sativum L. (JOY, 1973), en raíces de trigo (KRETOVICH et al, 1974), en hojas de Cucurbita maxima Duchesne. (POSTIUS et al, 1976) en raíces de Zea mays L. (GASPARIKOVA et al, 1978), entre otras especies.

1.1.2.- Glutamina sintetasa: Características.

La incorporación del nitrógeno amónico en nitrógeno en forma amida se lleva a cabo a través de la glutamina sintetasa (L-glutamato amonio ligasa) (E.C.6.3.1.2.), que en esquema es:



La glutamina sintetasa ha sido ampliamente investigada en bacterias, más concretamente en Escherichia coli (SHAPIRO y STADTMAN, 1970) y en otros microorganismos como Anabaena cylindrica (DHARMAWARDENE et al, 1973), Bacillus subtilis (REBELLO et al, 1969), Candida utilis (FERGUSON y SIMS, 1974), Klebsiella aerogenes (MEERS, TEMPEST y -- BROWN, 1970), Lactobacillus arabinosus (RAVEL et al 1965), Neurospora crassa y Aspergillus nidulans (PATEMAN, 1970) y - en Saccharomyces cerevisiae (KOHLOW et al, 1965). En plantas superiores, los estudios son bastante escasos (O'NEAL y JOY,

1974). El enzima ha sido recientemente purificado en hojas de Pisum sativum por O'NEAL y JOY (1973), en células en suspensión de Daucus carota por CALDOS (1971), en hojas de -- Lemna minor por RHODES y colaboradores (1975) y en nódulos de soja por MACPARLAND en 1976, entre otros.

El peso molecular encontrado para las -- distintas especies oscila entre 330000 y 376000, similar al encontrado en mamíferos (MEISTER, 1974) y menor al de bacterias (STADTMAN et al, 1974). En todas las caracterizadas -- hasta el momento, el enzima presenta ocho subunidades de peso molecular idéntico, 47000, dispuestas entre sí en dos -- grupos de tetrámeros planos (STADTMAN et al, 1974). En plantas superiores no se han detectado dos formas del enzima -- (KINGDOM, 1974); STEWART y ROWELL, 1975) similar a lo encontrado en bacterias, con una forma no adenilada no sujeta a control feedback, y otra adenilada más activa y sujeta a -- control feedback (MIFLIN y LEA, 1976).

La glutamina sintetasa presenta absolutos requerimientos de cationes divalentes, obteniéndose mayores niveles de actividad enzimática cuando utiliza Mg^{++} , al menos en hojas de Pisum sativum (O'NEAL y JOY, 1974) aunque -- funciona igualmente, pero con menor rendimiento en el caso de utilizar Mn^{++} ó Co^{++} . Paralelamente, SEGAL y colaboradores en 1972, en el enzima adenilado de Escherichia coli, y DEUEL y colaboradores en Bacillus subtilis, han descrito -- curvas de saturación para el Mg^{++} que no han sido encontradas en plantas superiores (WEBSTER, 1964). El pH óptimo de la glutamina sintetasa varía entre 5,2 y 8,3 dependiendo del catión divalente utilizado y de su concentración (O'NEAL y JOY, 1973).

El sistema de regulación del enzima en -- plantas superiores es objeto de estudio en la actualidad. -- Distintos autores han comprobado su regulación por ADP, AMP, P_i y aminoácidos como histidina, lisina y alanina, entre -- otros (WEBSTER y VARNER, 1955, O'NEAL y JOY, 1975; RHODES y STEWART, 1974).

Los valores de K_m para el NH_4^+ varían ampliamente dependiendo del tejido y especie en estudio. PAMI LJANS y colaboradores (1962) han encontrado un valor de --

$1,3 \times 10^{-5} \text{M}$ para la glutamina sintetasa de Pisum sativum, y VARNER en 1960 encontró un valor de $5 \times 10^{-5} \text{M}$ para el mismo material. Estas K_m son inferiores a las encontradas en Daucus carota ($K_m = 2,2 \text{mM}$) por O'NEAL y JOY (1973) en arroz -- ($K_m = \text{NH}_2\text{OH} = 4 \times 10^{-4} \text{M}$), y el enzima de Cucurbita moschata ($K_m = 6,7 \times 10^{-4} \text{M}$) (LIGNOWSKI et al, 1971). Es decir, en general la glutamina sintetasa de plantas superiores presenta bajos valores de K_m para el NH_4^+ .

En lo referente a su localización a nivel organular, la glutamina sintetasa se ha encontrado que está distribuida a lo largo de toda la planta. Así se ha detectado en raíces de guisante por NIFLIN y LEA (1975), en raíces de Lupinus (ROBERTSON et al, 1975), en hojas de Pisum sativum (WALLSGROVES et al, 1979), en hojas de Lemna minor (RHODES et al, 1976), en raíces de Oryza sativa (ARINA et al, 1977), en cotiledones de guisante (STOREY et al, 1978), en raíces de té (TAKEO, 1979) y en semillas de Secale cereale L. (BIELAWSKI, 1979) entre otras especies. Sin embargo, los estudios realizados sobre su localización en órganos -- de una misma planta son escasos. En este sentido, MARWAHA y colaboradores han estudiado los niveles de actividad glutamina sintetasa en raíces y tallos de plantas de arroz, y en 1980, KATO lo ha realizado en raíces y hojas de Citrus unshiu Marcovitch.

1.2.- Regulación de los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa y glutamina sintetasa por la funete nitrogenada.

Parece evidente, como se desprende de -- los estudios citados anteriormente que las condiciones ambientales, tanto fuente como concentración de nitrógeno controlan los niveles de actuación de estos enzimas, glutamato deshidrogenasa y glutamina sintetasa, así como sus funciones relativas en la incorporación del nitrógeno inorgánico en orgánico.

En plantas superiores, los distintos pasos en la asimilación orgánica del nitrógeno están separados en el espacio. En términos cualitativos, el metabolismo del nitrógeno en las diferentes partes de la planta es altamente dependiente de los procesos de translocación, a su vez

condicionados por el estado fisiológico de la planta y por las condiciones ambientales.

El nitrógeno está disponible en el suelo como NH_4^+ y como NO_3^- , siendo esta la forma más abundante -- (BRETELER, 1979), habiéndose sugerido que la absorción del nitrato estaría ligada mecánicamente a su reducción posterior, llevada a cabo por la nitrato y nitrito reductasas -- (SARKISSIAN y FOWLER, 1974), y estando ambos procesos inducidos por nitrato (FOWDEN, 1979). Los niveles de absorción y asimilación de ambos iones varían considerablemente dependiendo de las especies (TINKER, 1979), entre otros factores como temperatura, pH, etc. (EPSTEIN, 1972; WARNKE et al, -- 1974). La utilización de NH_4^+ del medio, en base a que se ha comprobado su difusión a través de membranas biológicas -- (MOORE y WILSON, 1977; VEECH, 1978), y las diferentes respuestas fisiológicas que muestran las plantas a la fuente nitrogenada en su crecimiento, hizo sugerir a ISHIHARA -- (1977) que esas diferencias pueden relacionarse con cambios en el metabolismo.

La contribución relativa de las raíces y de las hojas en la asimilación del nitrógeno varía con las especies, como se desprende de los estudios de OJI e IZAWA en 1974 en plantas de arroz (oryza sativa) y pepino (Cucumis sativus L.), de OGHOGHORIE y colaboradores (1971) y de PATE en 1973. Parte del nitrógeno absorbido se reduce en las raíces (WALLACE et al, 1965); BOWERMAN et al, 1971), translocándose el resto a las hojas donde se reduce (CHIAN-TAROTWONG et al, 1976; RAVEN et al, 1975). Según PATE y colaboradores (1975) la distribución de la reducción puede alterarse dependiendo de la fuente nitrogenada del medio externo. Por ejemplo, en 1974 MUHAMMAD y colaboradores observaron en plantas de arroz crecidas sobre nitratos absorbían este por las raíces y lo translocaban a las hojas donde se llevaba a cabo

la reducción para entrar en combinación orgánica; mientras que las plantas crecidas sobre amonio, el nitrógeno absorbido se reducía en las raíces en su totalidad. Por otra parte, HILL-COTTINGHAM (1979) considera que el nitrógeno cualquiera que sea su origen, se reduce a compuestos nitrogenados anteriormente a su translocación, dependiendo en cierta manera, la naturaleza del compuesto translocado de la fuente nitrogenada utilizada (IVANKO et al, 1971). Así, IVANKO y MAXINOVA en 1974 observaron que plantas de Zea mays transportaban principalmente glutamato cuando crecieron sobre nitratos, mientras que si lo habían hecho sobre amonio era nitrógeno en forma amida el compuesto fundamentalmente translocado. Paralelamente, LEWIS en 1975 ha identificado ese compuesto como glutamina; y en el mismo año, BIDWELL consideró que era la asparaguina el compuesto principalmente translocado en Leguminosas.

Parece evidente que todas o casi todas las plantas superiores, en base a la bibliografía consultada, presentan capacidad de asimilar amonio tanto via glutamato deshidrogenasa como glutamina sintetasa; teniendo en cuenta que los niveles de actividad de ambas enzimas dependen tanto de la fuente nitrogenada (DUKE et al, 1979) como de la concentración de nitrógeno del medio (RHODES et al, 1976). En este sentido, en bacterias MEERS, TEMPEST y BROWN en 1970, observaron un descenso en los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa cuando Klebsiella aerogenes crecía sobre nitratos, aumentándose la síntesis de glutamato en el caso de haber crecido sobre amonio. Por otra parte, el efecto represor del amonio sobre los niveles de actividad glutamina sintetasa está bien caracterizado en Escherichia coli, presentando un claro efecto inhibidor (GINSBURG et al, 1973). Paralelamente, KRETOVICH y colaboradores (1970) en Chlorella pyrenoidosa observaron que los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa ligada a NADP se incrementaban extraordinariamente por adición de amonio al medio de cultivo, reprimiéndose en caso de suplementar con nitrato, observándose lo contrario para el enzima dependiente de NAD. Resultados similares han obtenido TALLEY y colaboradores en otras cepas de Chlorella (1972). En plantas superiores, los trabajos realizados sobre la influencia del medio nitrogenado es mucho menor. En 1972, WEISSMAN, trabajando en raíces de soja, observó un aumento en los niveles de actividad glutamato --

deshidrogenasa dependiente de NAD en plantas crecidas sobre amonio frente a las crecidas sobre nitratos, determinando una respuesta contraria para el enzima con especificidad -- por NADP y para la glutamina sintetasa. De manera similar, KANAMORI y colaboradores (1972) han observado el efecto estimulante del amonio sobre el enzima glutamato deshidrogenasa de raices de arroz; resultados análogos han encontrado KRETOVICH y colaboradores en raices de Pisum sativum, en semillas de Lupinus y en raices de Cucurbita pepo (1971, 1972, 1973, respectivamente); CHOU y colaboradores en tallos de Zea mays (1973); BARASH y colaboradores en hojas de Avena sativa L.; RHODES en hojas de Lemna minor; SIHAG y colaboradores en Pisum sativum (1979) entre otros.

Sobre la posible influencia de la fuente nitrogenada, SHEPARD y THURMAN (1973) han sugerido que el incremento observado en la actividad glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD en plántulas de Lemna gibba al transferirlas de un medio con glutamato a otro con amonio podría deberse a la síntesis de novo del enzima, resultados no concordantes con los obtenidos por JOY en 1971. Por otra parte, CALDAS y colaboradores, en 1976, en callos de rosa han detectado la aparición de nuevos isoenzimas de la glutamato deshidrogenasa como consecuencia del tratamiento con amonio, al contrario de lo observado por BAYLEY y colaboradores (1972) en plantas de soja y trigo.

1.3.- Influencia de la luz.

El control de la asimilación del nitrógeno no realizado por la luz está suficientemente comprobado --- (ASLAM et al, 1973, ASLAM et al, 1979; HEWITT, 1976; TRAVIS et al, 1970; BEEVERS et al, 1969); sin embargo, no se ha llegado a una homología de criterio sobre el tipo de control ejercido por la luz, ya que algunas especies presentan requerimientos de luz para llevar a cabo la asimilación (SAWHNEY et al, 1978) mientras que otras especies la conllevan en -- oscuridad (RADIN, 1973; JONES et al, 1978).

El control positivo de las actividades nitrato y nitrito reductasas por luz está suficientemente documentado (HAGEMAN et al, 1960; BEEVERS et al, 1965; -- CANVIN et al, 1974), habiéndose sugerido una regulación similar para la glutamato sintasa (NEYRA y HAGEMAN, 1976).

La influencia de la luz sobre los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa es más discutida. Distintos investigadores han encontrado los mayores niveles de actividad enzimática en oscuridad (HALBROCK y RAGG, 1975; DEITZER et al, 1976; DUKE et al, 1977). Contrariamente, BROWN y HASLETT (1972) han observado incrementos en -- los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa en plantas de cebada sometidas a la luz. Respuestas similares han obtenido KRETOVICH y colaboradores (1971), VANKOVA y colaboradores (1973) en Chlorella, SAIRAM en raíces de Linum, etc.

Al igual que en bacterias y levaduras (SHAPIRO y STADTMAN, 1970; SIMS, 1975) parece ser que los niveles de actividad glutamina sintetasa en plantas superiores se alteran en presencia de luz (STEWART et al, 1977; -- RHODES et al, 1979). Así por ejemplo, JORDAN y colaboradores observaron que la acumulación de glutamina era del orden de tres veces superior en luz que en oscuridad, resultados similares a los obtenidos por NAYLOR y TOLBERT en -- 1956. De igual manera, GIVAN en 1975 y 1976 sugiere que el ATP necesario para la actuación de la glutamina sintetasa procede de la fotofosforilación. De esta manera, la luz actuaría como fuente de poder reductor a la vez que previene del agotamiento de ATP y glutamato que sólo pueden ser res--tablecidos en presencia de luz (MITCHELL et al, 1975).

Los estudios realizados a partir del pos--tulado de LEA y MIFLIN en 1974 se han dirigido fundamentalmente al análisis aislado de la glutamina sintetasa y de la glutamato sintasa, así como a la influencia que las distintas concentraciones de nitrato o amonio puedan ejercer sobre los enzimas asimilantes del amonio independiente.

La escasez de estudios comparados de la glutamina sintetasa y de la glutamato deshidrogenasa, dependiente de NADH como de NADPH, tanto a nivel simultaneo de los dos órganos que realizan la asimilación de nitratos mayoritariamente en relación con el tipo de fuente nitrogenada (nitrato o amonio) así como la respuesta a la concentración, nos sugirió la posibilidad de este análisis buscando la existencia de una ruta dominante en la asimilación o una posible complementariedad entre ambas a nivel de la plántula entera.

Por otra parte, la influencia que la luz pueda ejercer sobre la respuesta a la fuente nitrogenada no ha sido suficientemente estudiada dada la ausencia de bibliografía encontrada. Esta interacción entre tan importantes factores es el segundo objetivo del presente trabajo.

Fig. 1

MATERIALES Y METODOS

2.1.- Organismo utilizado y condiciones de cultivo.

El organismo utilizado para este trabajo ha sido Citrullus vulgaris L. variedad comercial reina.

El cultivo se llevó a cabo sobre arena - de cuarzo, lavada y esterilizada en placas petri en autoclave durante 30 minutos, a una atmósfera de presión, pasándolas a continuación a una estufa de secado Elektro Helios, donde se mantuvieron durante 2 horas a 120° C.

Para evitar que el cultivo se contaminara de hongos existentes en las cubiertas seminales, las semillas se esterilizaron superficialmente durante medio minuto, con cloruro mercurico al 1% , lavándolas a continuación con alcohol absoluto durante un minuto hasta que el agua de lavado no dió reacciones de cloruros.

Una vez terminados estos procesos de esterilización, se procedió a la siembra de diez semillas en cada placa, habiéndoseles producido una pequeña escariosis y colocando en cada placa 10ml de disolución nutritiva, todo ello en las condiciones más estrictas de esterilidad. La incubación de las placas se realizó a 26± 1°C en una estufa de cultivo y en oscuridad.

Como disoluciones nutritivas se utilizaron:

a).- agua destilada, en base a los estudios de DUKE y colaboradores (1978) entre otros.

b).- disolución base de Hoagland, según la composición descrita por HELLER (1969).

c).- variaciones en las concentraciones de NH_4^+ y NO_3^- cuyos límites permitidos para la acción de los enzimas en estudio: glutamato deshidrogenasa y glutamina sintetasa, se eligieron en base a los trabajos de VELIKY (1973) y WHETEREL y colaboradores (1976). Se utilizaron concentraciones de NO_3^- , suplementado como NO_3K , de 21mM y 99mM. Las concentraciones de NH_4^+ utilizadas, adicionado como $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ fueron 37mM y 75mM, incrementándose hasta 150mM dada la falta de respuesta diferencial obtenida con las concentraciones inferiores.

2.2.-Condiciones de iluminación.

Las semillas germinadas se iluminaron a partir del sexto día de germinación en oscuridad con tubos fluorescentes de luz blanca, marca Sylvania F 20 T₁₂ /D de 40 vatios, colocados a una distancia de la plántula tal que a su nivel, la energía radiante era de $12000 \text{ erg.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$, manteniéndose durante todo el tiempo de tratamiento una temperatura en la cámara de luz de $26 \pm 1^\circ\text{C}$. El tratamiento luminoso fue en régimen de iluminación continua.

2.3.- Obtención del extracto libre de células.

Las semillas, una vez lavadas en agua -- destilada para quitarles las sales que pudieran haber quedado adheridas del medio, se despojaron de su tegumento externo, y se separaron en dos lotes: cotiledones y raíces. Una vez pesadas se maceraron en un mortero, suspendiendo el macerado en tampón Tris-ClH 0,1M pH 8,2 con L-cisteína 0,02M en caso de ensayar la actividad glutamato deshidrogenasa, ó en tampón Tris-ClH 0,1M pH 7,5 si se ensayaba la actividad glutamina sintetasa, conteniendo, en este caso el tampón, - EDTA, 0,5M. En cada caso se añadieron 10ml de tampón por -- gramo de peso fresco utilizado.

La suspensión se sonicó en un sonicador MSE-100w durante un minuto a 8000 micrones. Posteriormente, se contrifugó a 20000xg durante 20 minutos a 4°C en una centrífuga, marca Beckman, modelo J2-21, pasando a continuación el sobrenadante por un filtro millipore GS de 0,22 μ , consiguiéndose así el extracto libre de células.

2.4.- Determinación de la actividad glutamato deshidrogenasa.

Los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa, tanto dependiente de NADH como de NADPH, se ensayaron espectrofotométricamente siguiendo la oxidación a 22°C del NADH ó NADPH a 340nm, en una mezcla de reacción que contenía: 20 μ moles de α -cetoglutarato, 240 μ moles de ClNH_4 , -- 0,4 μ moles de NAD(P)H, 0,5ml de extracto enzimático, y tampón Tris-ClH 0,1M pH 8,2 hasta completar un volumen final de 3ml.

En todos los casos y ensayos realizados, se llevaron a cabo controles paralelos, en los que se suprimieron los distintos substratos.

La actividad específica glutamato deshidrogenasa se expresa como $\Delta DO_{340}/mg$ de proteína/minuto. El descenso de densidad óptica a 340 nm se midió en un espectrofotómetro marca Zeiss, modelo PM2 DL.

2.5.- Determinación de la actividad glutamina sintetasa.

La actividad glutamina sintetasa se determinó midiendo la formación de γ -glutamil hidroxamato formado cuando se emplea hidroxilamina como substrato. Los niveles de actividad se determinaron por una modificación del método descrito por ELLIOT (1955) según los trabajos de -- MARWAHA y colaboradores (1976).

La mezcla de reacción contenía: 0,6 μ moles de ATP, 41,5 μ moles de glutamato sódico. 0,3 μ moles de SO_4Mg , 3 μ moles de NH_2OH neutralizada a pH 7,2 con NaOH - 2N, 0,3 μ moles de cisteína llevada a neutralidad con NaOH, - 0,5ml de extracto enzimático, 0,5ml de tampón Tris-ClH 0,1M pH 7,5, y agua destilada hasta completar un volumen final de 3ml. La reacción se iniciaba por adición del glutamato sódico. Después de 15 minutos de reacción a 30°C, el γ hidroxamato formado se determinó añadiendo 1ml de reactivo de Cl_3Fe preparado con $Cl_3Fe.6H_2O$ al 10% en ClH 0,2N, TCA al 24% y ClH 50% en volúmenes iguales. Inmediatamente después, los tubos de reacción y los controles se centrifugaron a -- 5000xg durante 10 minutos. Posteriormente, se determinó la absorbancia a 540nm del sobrenadante, comparándose a continuación con una recta patrón de γ -glutamil hidroxamato formado bajo idénticas condiciones.

Paralelamente, se realizaron controles en los cuales se habían omitido separadamente ATP, enzima y glutamato sódico.

Se define como unidad de actividad específica glutamina sintetasa, la formación de un micromol de γ -glutamil hidroxamato formado por mg de proteína y por minuto.

2.6.- Determinación de la cantidad de proteínas.

Las proteínas de los extractos libres de células se valoraron por el método de WARBURG y CHRISTIAN - de determinación de la densidad óptica de 260 y 230 nm a la solución de proteínas de la forma descrita por LAYNE.

2.7.- Electroforesis de la glutamato deshidrogenasa.

Se realizó la electroforesis de la glutamato deshidrogenasa en gel de poliacrilamida al 6,5%. Se -- llevó a cabo a 4°C según el método descrito por DAVIS (1960) utilizando tampón Tris-Glicina pH 8,3 y una corriente de -- 2mA por columna durante los primeros 15 minutos, y posterior~~or~~ mente de 5mA durante 30 minutos. Se utilizó como indicador frontal azul de bromofenol. Los isoenzimas de la glutamato deshidrogenasa se detectaron visualmente en los geles con - colorantes del tetrazolium (THURMAN et al, 1965). La mezcla de reacción contenía por ml: 5mg de ácido L-glutámico, 1mg de NAD(P), 0,1mg de 5-metilphenazinium methosulfato (PMS), 0,5mg de 3-(4,5-dimetil tiazolil-2) 2,5-difenil tetrazolium bromide (MTT) y tampón Tris-ClH 0,1M pH 8,2.

Paralelamente se realizaron controles, - en los cuales se habían omitido en la mezcla de reacción -- NAD(P), PMS ó ácido L-glutámico, observándose que en estos casos no ocurría la deposición de formazán.

De manera similar, se realizó la electroforesis de la glutamina sintetasa según el método descrito por BARRAT (1980) único encontrado en la bibliografía, no - detectándose la aparición de bandas isoenzimáticas.

2.8.- Utilización de inhibidores de la síntesis de proteínas.

Las plántulas crecidas durante seis días en oscuridad fueron seccionadas por el hipocotilo en su inserción tanto con los cotiledones como con las raíces. Estos dos últimos órganos, así obtenidos, se mantuvieron en sus-- pensión durante 24 horas en presencia del inhibidor de síntesis de proteínas, bien sometidos a tratamiento oscuro o - bien iluminados con luz blanca continua. En todos los casos se ensayaron los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa y glutamina sintetasa. Los inhibidores de síntesis de

proteínas utilizados fueron: actinomicina D, inhibidor a nivel de la transcripción por formación de complejos con el DNA mediante puentes de hidrógeno con los residuos desoxiguanina del ácido nucleico; y cicloheximida o cloranfenicol, inhibidores de la síntesis a nivel de traducción, el primero a nivel de los ribosomas 80S de las células eucarióticas y el segundo a nivel de los ribosomas 70S de las procarióticas y 80S de cloroplastos y mitocondrias. Las concentraciones de inhibidores de síntesis protéica utilizados fueron - actinomicina D 20 µg/ml, cicloheximida 150µg/ml y cloranfenicol 200µg/ml.

164

RESULTADOS

3.1. Control de los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa en plántulas crecidas en oscuridad continua dependiendo de la fuente nitrogenada del medio de incubación.

Se han estudiado los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa, tanto NADH como NADPH dependientes en plántulas de Citrullus vulgaris crecidas en régimen de oscuridad continua a lo largo de ocho días, determinándose los niveles de actividad enzimática a intervalos de 24 horas, tanto en cotiledones como en raíces. El medio nutritivo contenía como fuente nitrogenada bien nitratos (21mM, 75 mM ó 99mM) o bien amonio (37mM, 75mM ó 150mM). El tiempo cero corresponde a la semilla completa después de hora y media de imbibición, no diferenciándose, hasta el tercer día, suficientemente los órganos de la planta.

3.1.1.- Acción de los nitratos sobre los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa.

En cotiledones, la actividad glutamato - deshidrogenasa dependiente de NADH (Figura 1) alcanza los mayores niveles cuando se utiliza nitrato 21mM frente a los inferiores obtenidos en el caso de utilizar nitrato 99mM, alcanzándose valores intermedios con nitrato 75mM, siendo los mayores los obtenidos de las plántulas crecidas en agua, fundamentalmente a partir del quinto día de germinación. La actividad glutamato deshidrogenasa ligada a NADPH (Figura 2) no se ve afectada significativamente por el aumento de la concentración de nitratos en el medio de incubación, ni siquiera durante los últimos días de tratamiento.

Los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa dependiente de NADH (Figura 1) son del orden de cinco a diez veces superiores a los encontrados para el enzima que utiliza NADPH (Figura 2).

Desde el momento en que puede considerarse diferenciada la raíz, tercer día de tratamiento, los niveles de actividad enzimática dependiente de NADH (Figura 3) experimentan un aumento hasta el quinto día para las crecidas sobre nitratos 21mM y 75mM, alcanzándose los mayores niveles en el primer caso y descendiendo drásticamente hasta

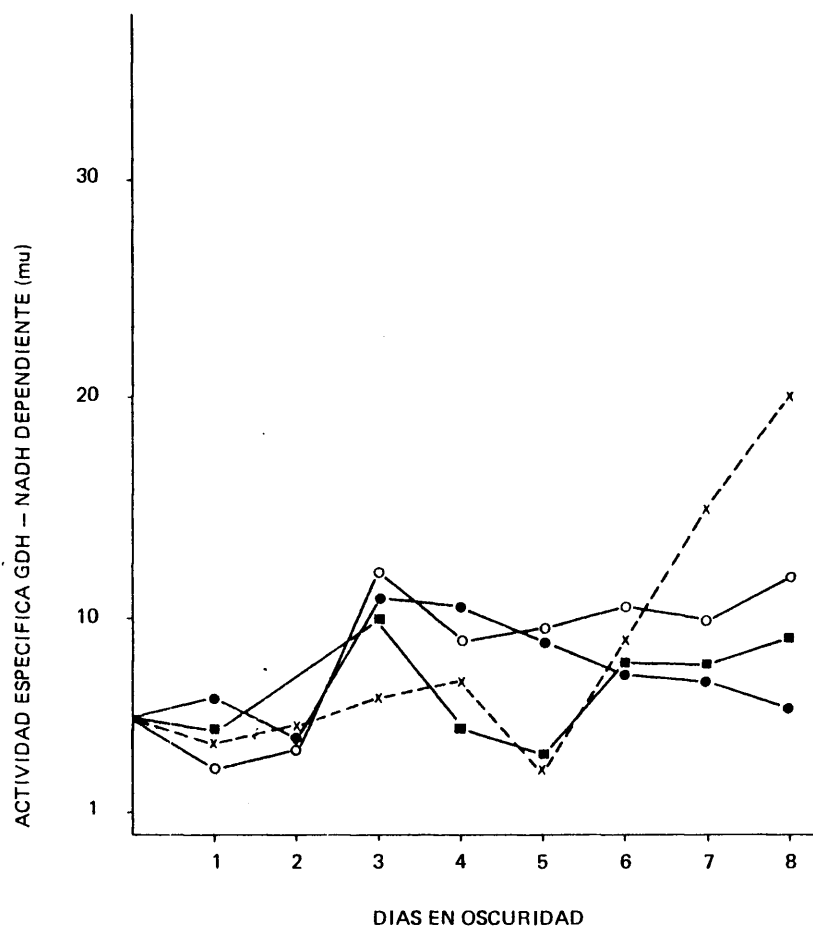


Figura 1.- Actividad específica glutamato deshidrogenasa -- dependiente de NADH en cotiledones de plántulas crecidas en oscuridad continua durante un período de ocho días. Las concentraciones de nitratos del medio utilizado fueron: 21mM (o—o), 75mM (■—■), 99mM (●—●) y agua (x—x).

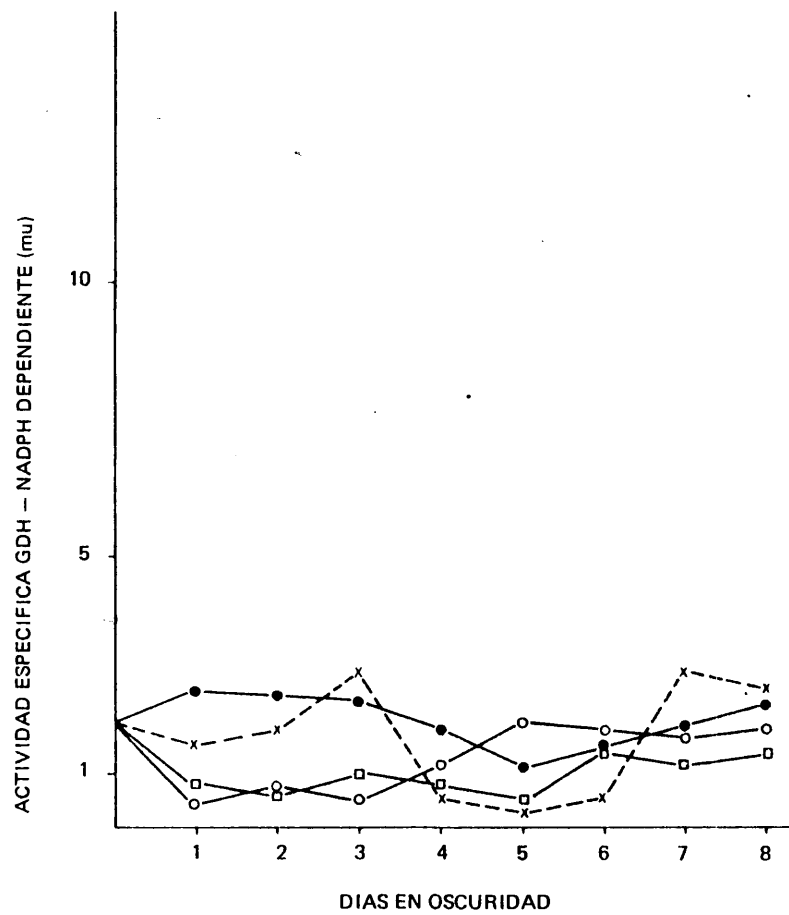


Figura 2.- Actividad específica glutamato deshidrogenasa de pendiente de NADPH en cotiledones de plántulas - crecidas en oscuridad continua durante un período de ocho días. Las concentraciones de nitratos utilizadas fueron: 21mM (o—o), 75mM (□—□), - 99mM (●—●) y agua (x--x).

el final del tratamiento; por el contrario, la utilización de nitrato 99mM provoca los menores niveles de actividad -- enzimática, pero estables a lo largo de todo el tiempo de -- experimentación salvo en el último día, que sufre un marcado descanso. Los mayores niveles de actividad glutamato deshidrogenasa ligada a NADH obtenidos al final del tratamiento son inversos a las concentraciones del medio, similar a lo obtenido en cotiledones.

Cuando el enzima utilizaba NADPH como -- cofactor (Figura 4), los mayores niveles de actividad glutamato deshidrogenasa se alcanzaron en raices de plántulas -- crecidas sobre nitrato 99mM, experimentando un aumento paulatino a lo largo de los días de tratamiento; mientras que las crecidas sobre NO_3^- 21mM y 75mM experimentaban un drástico aumento entre el tercer y cuarto día de crecimiento descendiendo ligeramente los niveles de actividad enzimática -- de las crecidas sobre nitratos 21mM, siendo más acusado en las crecidas sobre 75mM.

Los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa NADH dependiente (Figura 3) son del orden de cinco a veinte veces superiores a los encontrados para el enzima ligado a NADPH (Figura 4).

Los niveles de actividad enzimática máximos alcanzados en cotiledones por el enzima dependiente de NADH son siempre inferiores a veinte miliunidades, en tanto que en raices se alcanzan niveles de actividad glutamato deshidrogenasa de hasta 300 miliunidades. De forma similar, los mayores niveles de actividad glutamato deshidrogenasa obtenidos para el enzima dependiente de NADPH en cotiledones son inferiores a tres miliunidades frente a las cincuenta -- miliunidades obtenidas en raices.

3.1.2.- Influencia del amonio sobre los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa.

En cotiledones (Figura 5), para la concentración más baja de amonio, a partir del segundo día de experimentación se mantienen constantes los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa dependiente de NADH, mientras

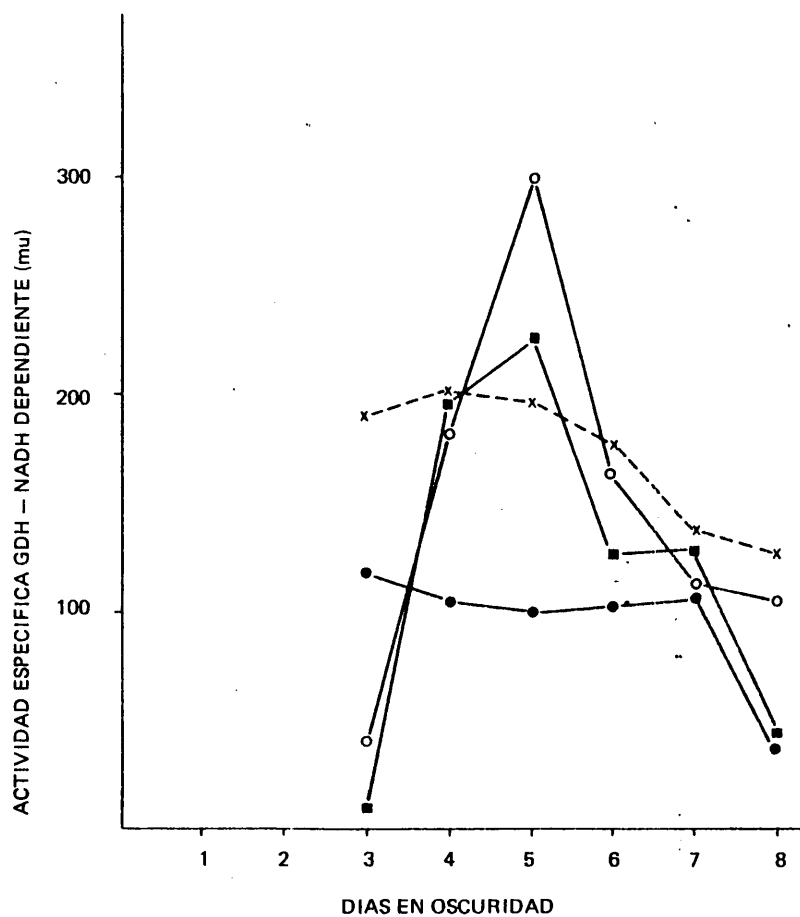


Figura 3.- Actividad específica glutamato deshidrogenasa de pendiente de NADH en raíces de plántulas crecidas en oscuridad continua durante un periodo de ocho días. Las concentraciones de nitratos utilizados fueron: 21mM (o—o), 75mM (■—■), 99mM (●—●) y agua (x---x).

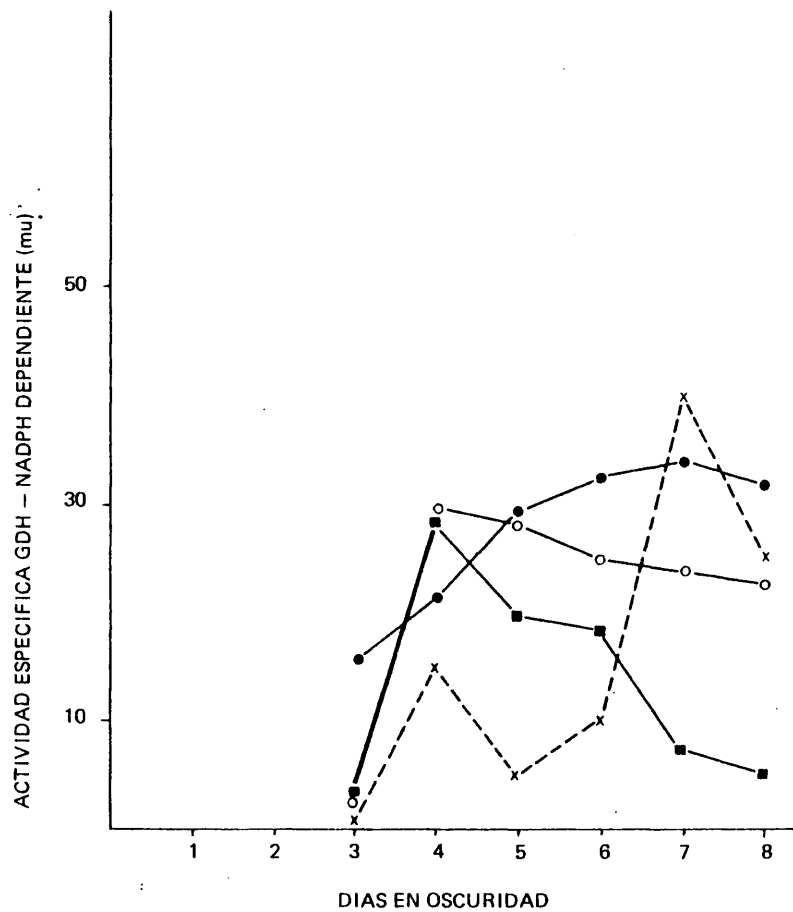


Figura 4.- Actividad específica glutamato deshidrogenasa de pendiente de NADPH en raíces de plántulas crecidas en oscuridad continua durante un periodo de ocho días. Las concentraciones de nitrato utilizadas fueron: 21mM (○—○), 75mM (■—■), 99mM -- (●—●) y agua (x---x).

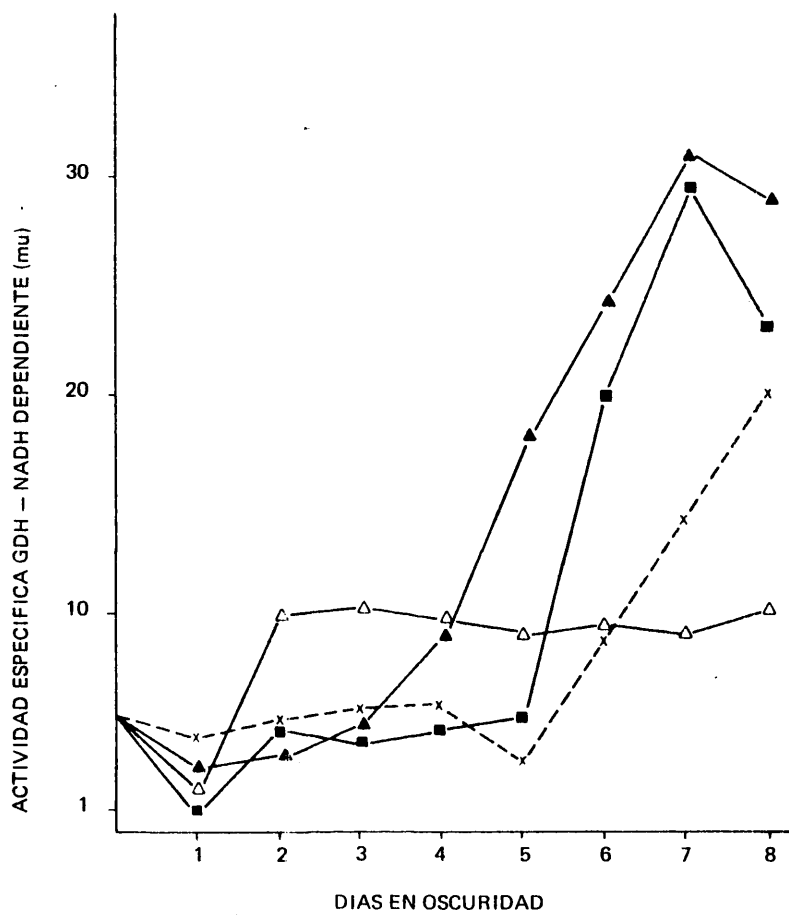


Figura 5.- Actividad específica glutamato deshidrogenasa - dependiente de NADH en cotiledones de plántulas crecidas en oscuridad continua durante un periodo de ocho días. Las concentraciones de amonio utilizadas fueron: 37mM (Δ — Δ), 75mM (\blacksquare — \blacksquare), 150mM (\blacktriangle — \blacktriangle) y agua (x--x).

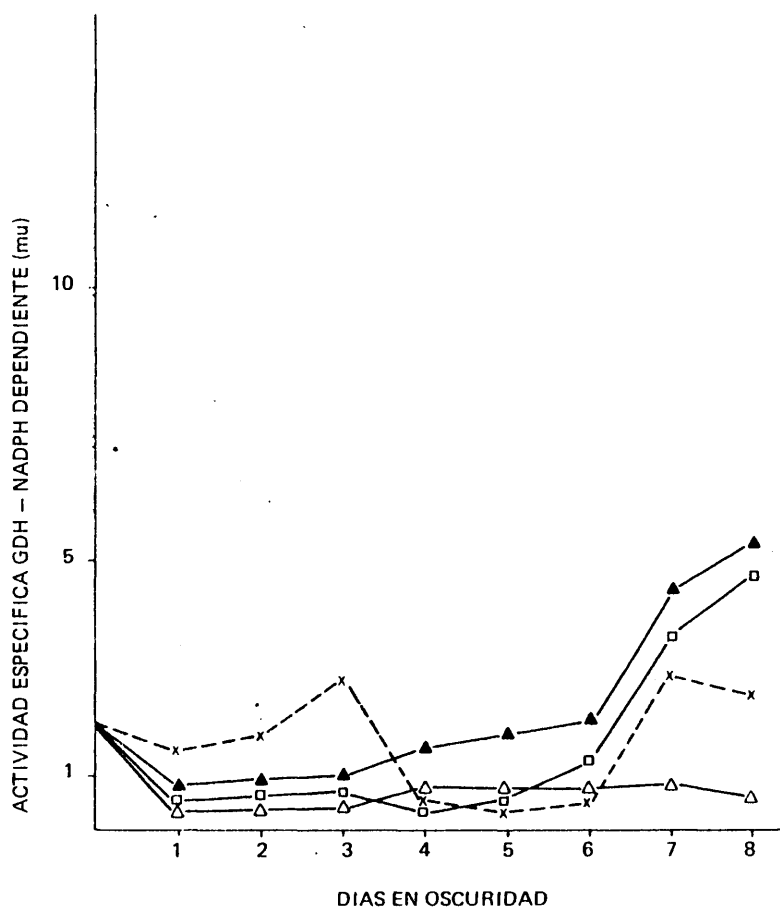


Figura 6.- Actividad específica glutamato deshidrogenasa de pendiente de NADPH en cotiledones de plántulas - crecidas en oscuridad continua durante un período de ocho días. Las concentraciones de amonio - utilizadas fueron: 37mM (Δ—Δ), 75mM (□—□), -- 150mM (▲—▲) y agua (x---x).

que tanto para las crecidas en agua como sobre los otros -- dos medios utilizados sufren un incremento, practicamente -- hasta el final del tratamiento. Los niveles de actividad en zimática son significativamente superiores cuando se utiliza amonio 150mM y 75mM frente a los obtenidos con la concentración más baja de amonio y el agua. Resultados similares son los obtenidos cuando el enzima utiliza NADPH como cofec-- tor (Figura 6). Los niveles de actividad glutamato deshidro-- genasa ligada a NADPH son del orden de aproximadamente seis veces inferiores a los obtenidos con NADH.

Los niveles de actividad glutamato deshi-- drogenasa dependiente de NADH detectados en raices (Figura 7) presentan un máximo de actividad al quinto día para el -- medio con amonio 37mM, mientras que para las otras dos con-- centraciones de amonio utilizadas lo presentan al séptimo -- día de experimentación, a partir del cual los mayores nive-- les de actividad enzimática se obtienen para la máxima con-- centración de amonio. El comportamiento de las plántulas -- crecidas en agua es similar al de las crecidas en la concen-- tración más baja de amonio.

Los niveles de actividad glutamato deshi-- drogenasa dependiente de NADPH (Figura 8) experimentan un -- aumento paulatino a lo largo de los días de tratamiento, -- hasta el séptimo día, para todos los medios utilizados, de-- creciendo durante el último día de experimentación para las mayores concentraciones de amonio.

Los niveles máximos de actividad enzimá-- tica dependiente de NADPH son siempre inferiores a cincuen-- ta miliunidades (Figura 8), en tanto que para el enzima li-- gado a NADH llega a alcanzar hasta las trecientas miliu-- nidades.

En cotiledones, los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa dependiente de NADH son del orden de aproximadamente ocho veces inferiores que para el enzima de raices. Resultado similar al obtenido para el enzima li-- gado a NADPH.

3.2.- Control de los niveles de actividad glutamina sinteta-- sa en plántulas crecidas en oscuridad continua dependiendo de la fuente nitrogenada del medio de incubación.

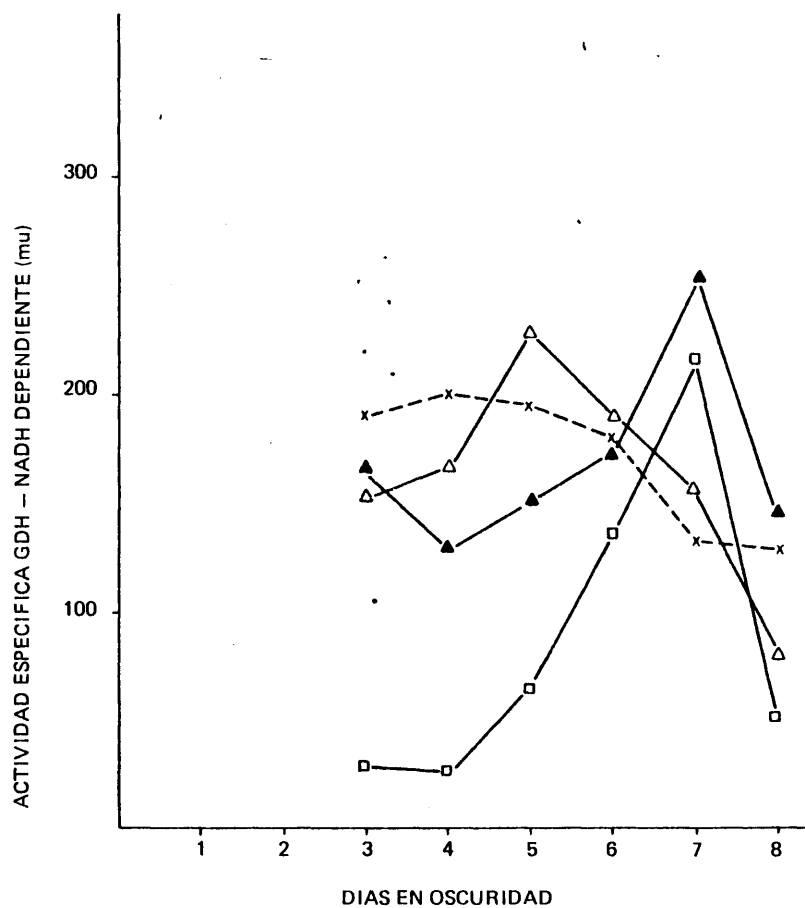


Figura 7.- Actividad específica glutamato deshidrogenasa de pendiente de NADH en raíces de plántulas crecidas en oscuridad contínua durante un periodo de ocho días. Las concentraciones de amonio utilizadas fueron: 37mM (Δ—Δ), 75mM (□—□), 150mM -- (▲—▲) y agua (x—x).

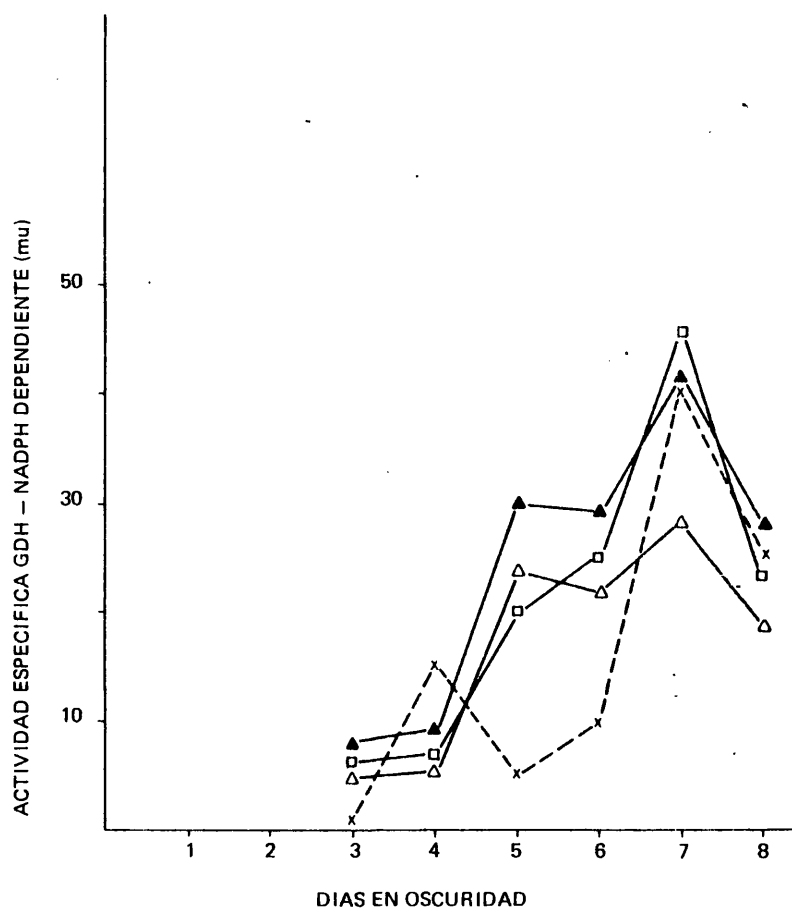


Figura 8.- Actividad específica glutamato deshidrogenasa dependiente de NADPH en raíces de plántulas crecidas en oscuridad continua durante un período de ocho días. Las concentraciones de amonio utilizadas fueron: 37mM (Δ — Δ), 75mM (\square — \square), 150mM (\blacktriangle — \blacktriangle) y agua (x---x).

Se han estudiado los niveles de actividad glutamina sintetasa en plántulas de Citrullus vulgaris siguiendo el mismo protocolo al descrito para la glutamato deshidrogenasa en el apartado 3.1.

3.2.1.- Influencia de los nitratos sobre los niveles de actividad glutamina sintetasa.

En cotiledones (Figura 9) se observa un descenso generalizado en los niveles de actividad glutamina sintetasa hasta el tercer día para las plántulas crecidas sobre las mayores concentraciones de nitratos y sobre agua, y hasta el quinto día para las menores concentraciones, a partir de los cuales se mantienen constantes. Los mayores niveles de actividad enzimática a lo largo de todo el tiempo de tratamiento, se obtienen para nitrato 99mM, frente a las otras dos concentraciones de nitrato utilizadas.

En raíces (Figura 10), los niveles de actividad glutamina sintetasa presentan un descenso en todos los casos hasta el quinto día, a partir del cual se mantienen constantes. No se observan diferencias apreciables en los niveles de actividad enzimática con las distintas concentraciones de nitrato utilizados.

3.2.2.- Acción del amonio sobre los niveles de actividad glutamina sintetasa.

En cotiledones (Figura 11) los niveles de actividad glutamina sintetasa descienden hasta el cuarto día de tratamiento, a partir del cual se mantienen más o menos constantes hasta el final. A lo largo de todo el tiempo de experimentación, en líneas generales, los mayores niveles de actividad enzimática corresponden a las menores concentraciones de amonio, disminuyendo a medida que aumenta su concentración.

En raíces (Figura 12), el descenso en los niveles de actividad glutamina sintetasa es progresivo durante todo el periodo de experimentación, siendo más acusado entre los días tercero y sexto. Los mayores niveles de actividad enzimática a lo largo de todo el tiempo de expe-

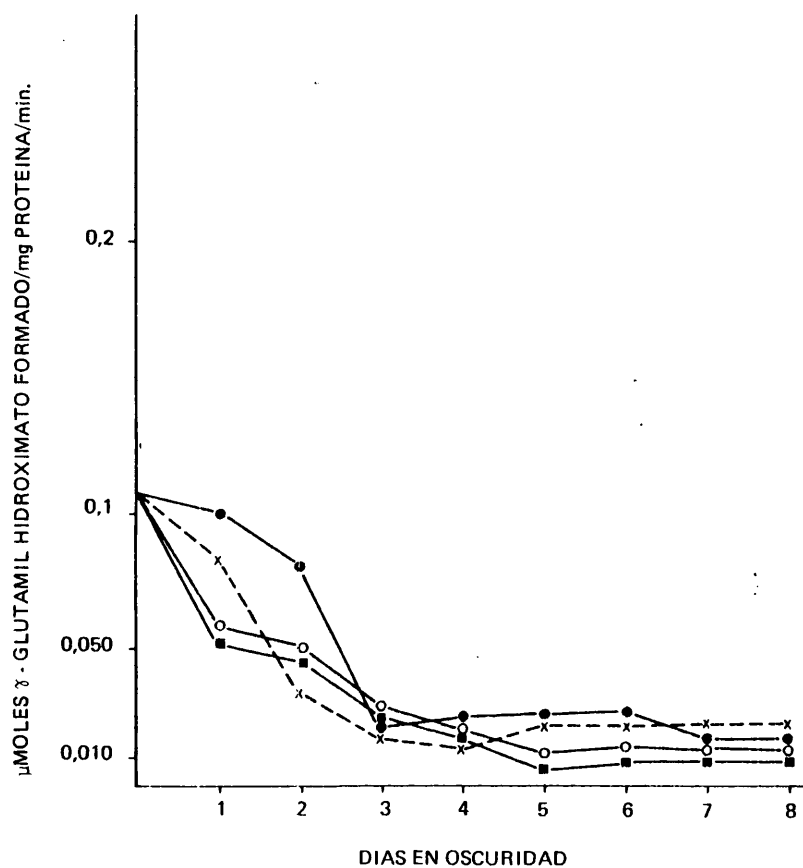


Figura 9.- Actividad específica glutamina sintetasa en cotiledones de plántulas crecidas en oscuridad durante un periodo de ocho días. Las concentraciones de nitrato utilizadas fueron: 21mM (○—○), 75mM (■—■), 99mM (●—●) y agua (x---x).

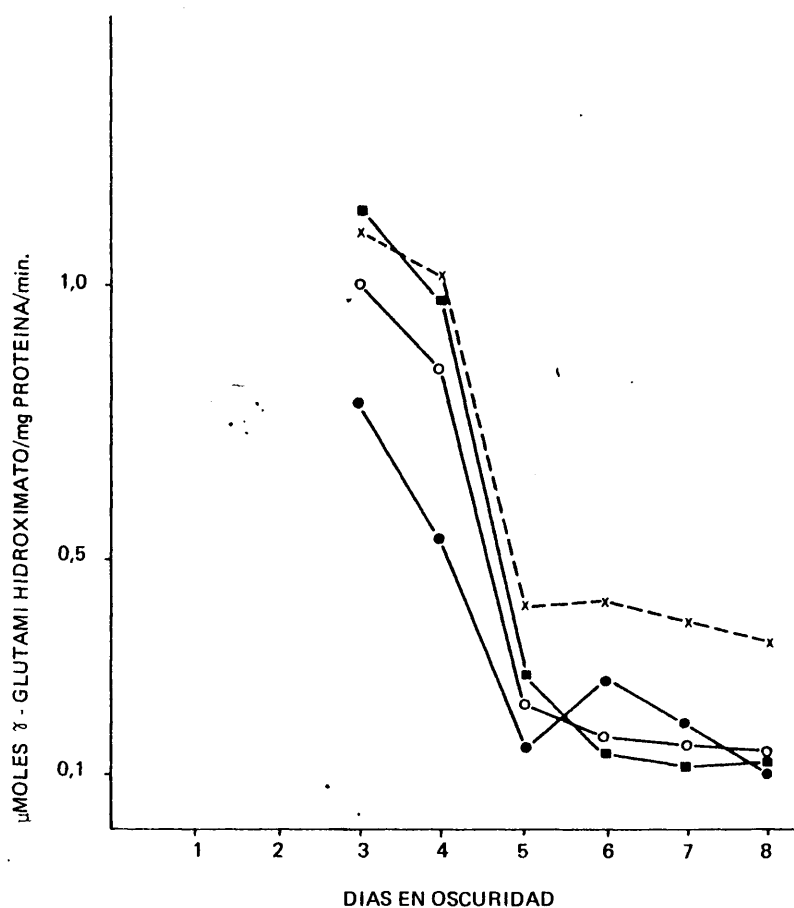


Figura 10.- Actividad específica glutamina sintetasa en raíces de plántulas crecidas en oscuridad durante un periodo de ocho días. Las concentraciones de nitrato utilizadas fueron: 21mM (○—○), 75mM -- (■—■), 99mM (●—●) y agua (x---x).

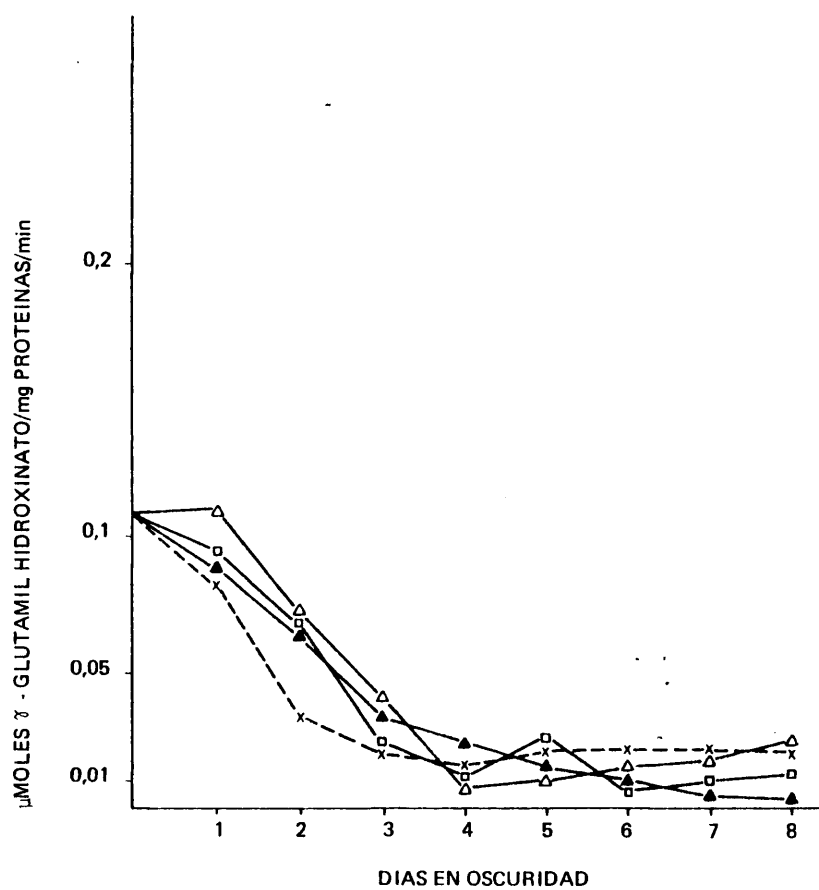


Figura 11.- Actividad específica glutamina sintetasa en cotiledones de plántulas crecidas en oscuridad durante un periodo de ocho días. Las concentraciones de amonio utilizadas fueron: 37mM (Δ—Δ), 75mM (□—□), 150mM (▲—▲) y agua (x—x).

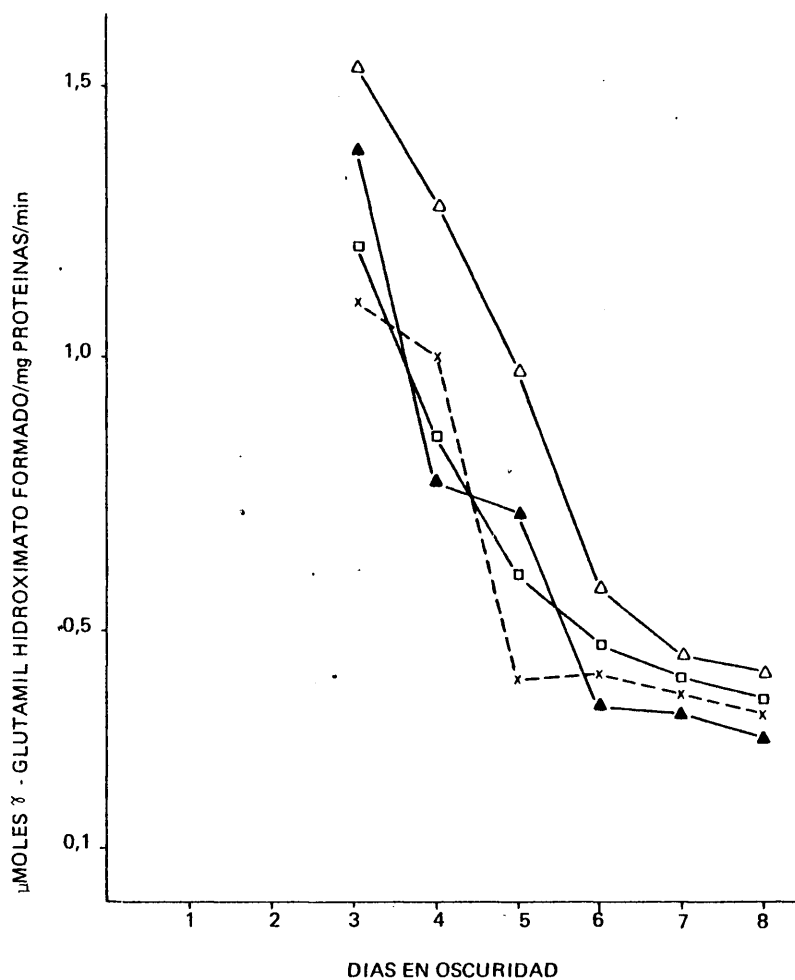


Figura 12.- Actividad específica glutamina sintetasa en raíces de plántulas crecidas en oscuridad durante un periodo de ocho días. Las concentraciones de amonio utilizadas fueron: 37mM (Δ — Δ), 75mM (\square — \square), 150mM (\blacktriangle — \blacktriangle) y agua (x—x).

rimentación, vuelven a corresponder a las menores concentraciones de amonio, disminuyendo progresivamente al ir aumentando la concentración de amonio en el medio de incubación.

3.3.- Influencia de la luz sobre los niveles de actividad - glutamato deshidrogenasa.

Las plántulas crecidas durante seis días en oscuridad, se sometieron a tres tipos de tratamiento luminosos:

- iluminación con luz blanca continua durante cinco días consecutivos.

- iluminación con luz blanca continua durante dos días, transfiriéndose a continuación a oscuridad, donde permanecieron tres días.

- iluminación con luz blanca continua durante dos días, seguido de un día de oscuridad y pasando las plántulas nuevamente a tratamiento con luz blanca durante tres días consecutivos.

3.3.1.- Efecto de la luz sobre los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa de plántulas crecidas sobre nitratos.

En cotiledones, la actividad glutamato deshidrogenasa dependiente de NADH (Figura 13) presenta un máximo al segundo día de iluminación con luz blanca para las plántulas crecidas sobre nitrato 2mM, mientras que para el agua lo presentan al tercer día, descendiendo posteriormente hasta el final del tratamiento. Por el contrario, las crecidas sobre la mayor concentración de nitrato experimentan un aumento continuo a lo largo de todo el tiempo de tratamiento, al final del cual presentan los mayores niveles de actividad glutamato deshidrogenasa.

Cuando el enzima utiliza NADPH como cofactor (Figura 14), los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa presentan el mismo comportamiento que en el caso anterior, salvo la de plántulas crecidas en agua que presentan los menores niveles de actividad enzimática. Los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa dependiente de NADPH no superan las cinco miliunidades, frente a los encontrados para el enzima ligado a NADH que son siempre superiores a esa cantidad.

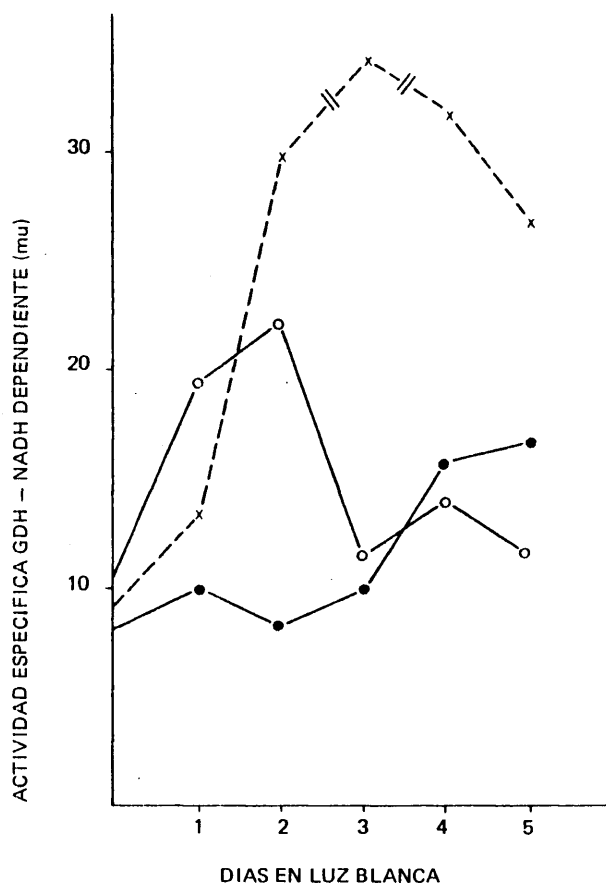


Figura 13.- Actividad especifica glutamato deshidrogenasa - dependiente de NADH en cotiledones de plántulas crecidas durante seis días en oscuridad, sometidas a luz blanca continua durante cinco días. - Las concentraciones de nitrato utilizadas fueron: 21mM (o—o), 99mM (●—●) y agua (x—x).

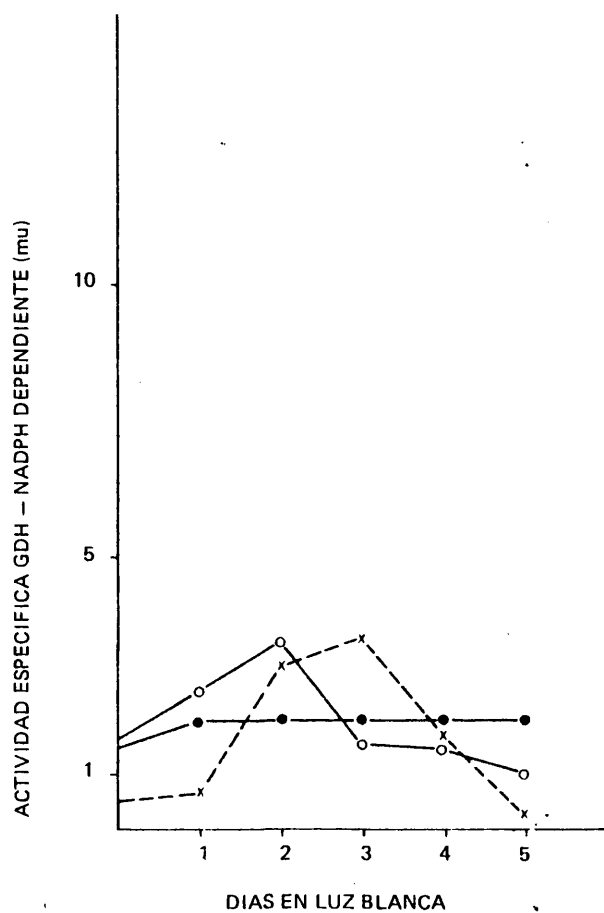


Figura 14.- Actividad específica glutamato deshidrogenasa - dependiente de NADPH en cotiledones de plántulas crecidas durante seis días en oscuridad, sometidas a luz blanca continua durante cinco días. Las concentraciones de nitrato utilizadas fueron: 21mM (o—o), 99mM (●—●) y agua (x---x).

Los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa dependiente de NADH (Figura 15) experimentan un marcado descenso en el primer día de iluminación con luz blanca independientemente del medio utilizado, manteniéndose a partir de entonces en las raíces de plántulas crecidas sobre nitrato 21mM y agua, obteniéndose los mayores niveles de actividad enzimática durante todo el tiempo de tratamiento cuando crecieron sobre nitrato 99mM. Para el enzima ligado a NADPH (Figura 16), luz blanca provoca un mantenimiento en los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa hasta aproximadamente el tercer día de tratamiento, a partir del cual en las plántulas crecidas sobre agua y el medio menos concentrado sufren un marcado descenso frente a las mantenidas en nitrato 99mM que mantienen los máximos niveles de actividad enzimática a lo largo de todo el tiempo de experimentación.

Los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa dependiente de NADH en raíces son siempre superiores a cincuenta miliunidades, mientras que para el enzima ligado a NADPH no superan las cuarenta y cinco miliunidades.

En cotiledones, los niveles de actividad enzimática dependiente de NADH son siempre inferiores a cuarenta miliunidades, en tanto que en raíces se alcanzan niveles de actividad glutamato deshidrogenasa de hasta trescientas miliunidades. De forma similar, los niveles de actividad del enzima ligado a NADPH en cotiledones son inferiores a cuatro miliunidades, mientras que en raíces alcanza como mínimo cinco miliunidades.

En cotiledones, los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa dependiente de NADH (Figura 17) sufren un marcado aumento cuando se transfieren de nuevo a oscuridad después de dos días de iluminación con luz blanca, descendiendo al cuarto día de tratamiento en el caso de plántulas crecidas en agua, mientras que las crecidas en nitrato 21mM y 99mM mantienen niveles hasta el final del tiempo de experimentación. Resultados similares se obtienen para el enzima que utiliza NADPH (Figura 18).

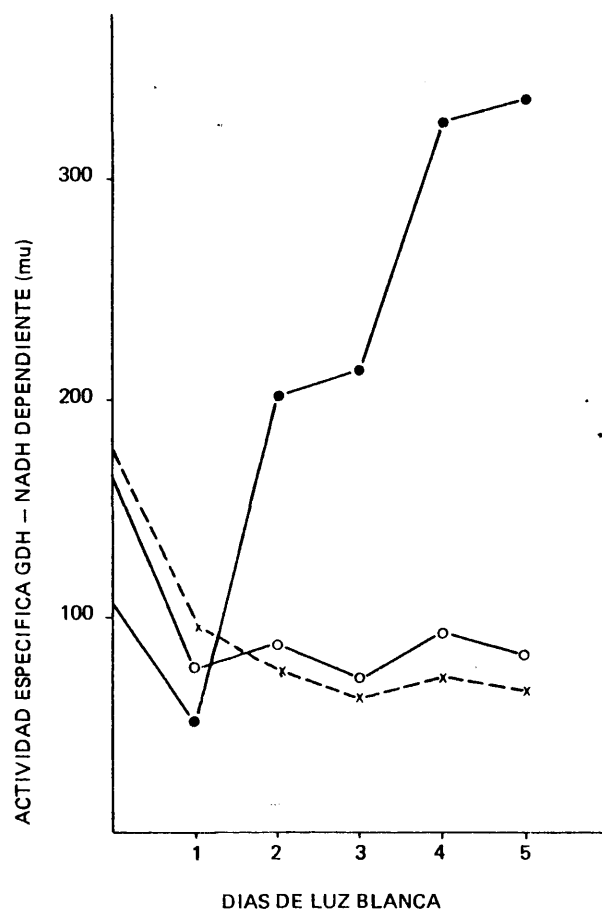


Figura 15.- Actividad específica glutamato deshidrogenasa - dependiente de NADH en raíces de plántulas crecidas durante seis días en oscuridad, sometidas a luz blanca continua durante cinco días. Las concentraciones de nitrato utilizadas fueron: 21mM (o—o), 99mM (●—●) y agua (x—x).

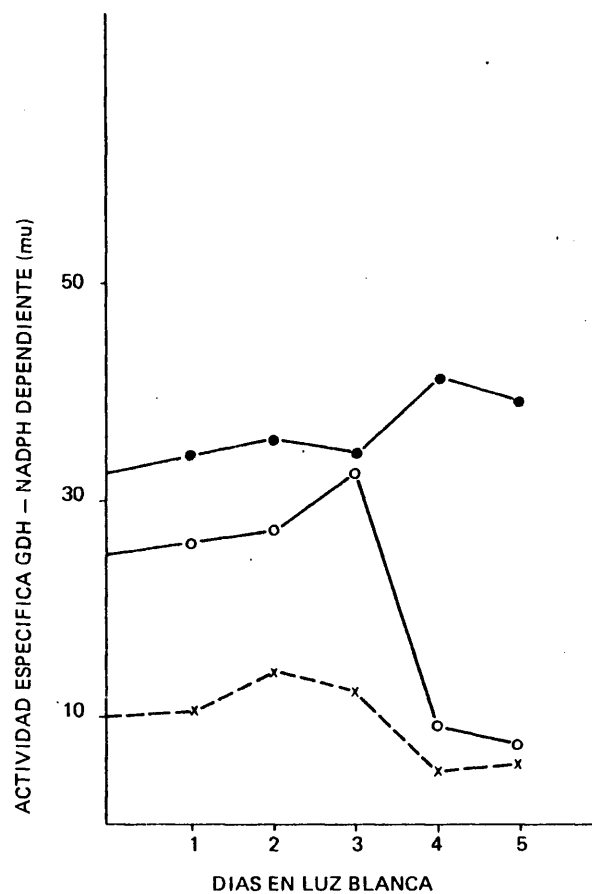


Figura 16.- Actividad específica glutamato deshidrogenasa dependiente de NADPH en raíces de plántulas crecidas durante seis días en oscuridad, sometidas a luz blanca continua durante cinco días. Las concentraciones de nitrato utilizadas fueron: 21mM (o—o), 99mM (●—●) y agua (x--x).

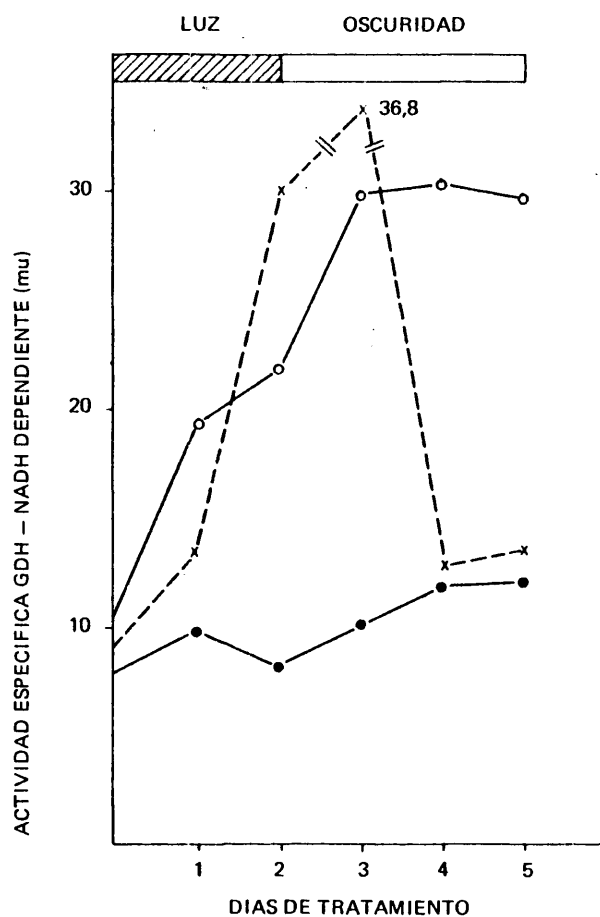


Figura 17.- Actividad específica glutamato deshidrogenasa - dependiente de NADH en cotiledones de plántulas crecidas durante seis días en oscuridad, sometíendolas a dos días de iluminación con luz -- blanca y a tres días de tratamiento oscuro a -- continuación. Las concentraciones de nitrato -- utilizadas fueron: 21mM (o—o), 99mM (●—●) y agua (x—x).

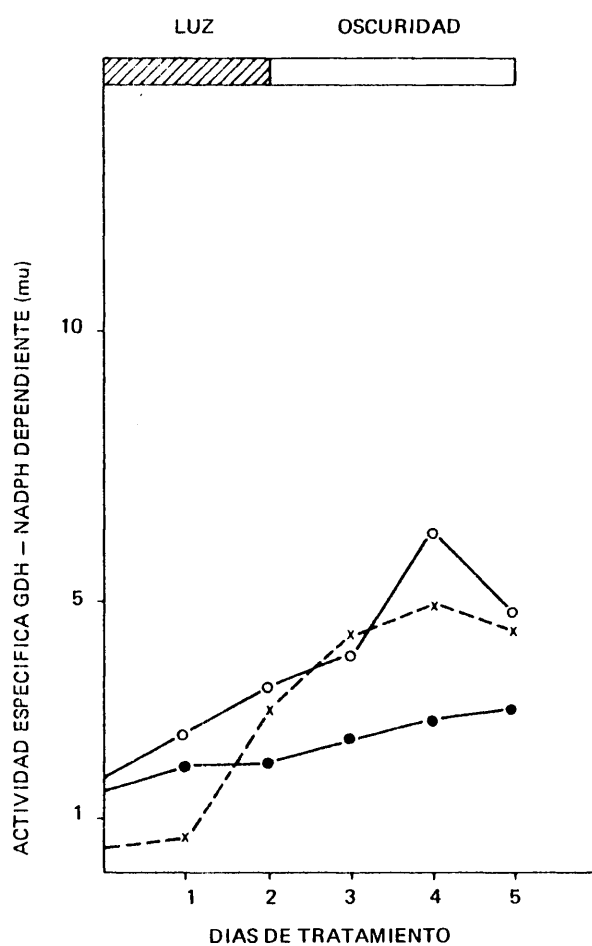


Figura 18.- Actividad específica glutamato deshidrogenasa - dependiente de NADPH en cotiledones de plántulas crecidas durante seis días en oscuridad, so metiéndolas a dos días de iluminación con luz - blanca y a tres días de tratamiento oscuro a - continuación. Las concentraciones de nitrato - utilizadas fueron: 21mM (o—o), 99mM (●—●) y agua (x---x).

Los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa dependiente de NADPH son del orden de aproximadamente cinco veces inferiores a los obtenidos con NADH (Figura 17).

En raíces, la oscuridad provoca un aumento en los niveles de actividad enzimática dependiente de NADH (Figura 19) al tercer día de tratamiento, a partir del cual experimentan un descenso, más marcado en el caso de utilizar nitrato 99mM. Para el enzima ligado a NADPH (Figura 20), se obtienen resultados similares a los anteriores, pero consiguiendo como máximo cuarenta miliunidades frente a las cincuenta miliunidades obtenidas como mínimo para el enzima que utiliza NADH.

Los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa NADH dependiente alcanzados en cotiledones son varias veces inferiores a los encontrados en raíces, al igual que los encontrados para el enzima que utiliza NADPH.

Cuando se intercala un día de oscuridad entre el segundo y tercer día de tratamiento con luz blanca continua, los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa dependiente de NADH en cotiledones (Figura 21) experimentan un aumento hasta aproximadamente el cuarto día de experimentación, a partir del cual sufren un ligero descenso en las plántulas crecidas sobre agua y sobre nitrato 21mM, mientras que las crecidas sobre nitrato 99mM sufren un aumento a lo largo de todo el tiempo de tratamiento. Resultados similares se obtienen cuando el enzima utiliza NADPH (Figura 22), siendo los mayores niveles de actividad enzimática los obtenidos de plántulas crecidas sobre nitrato 21mM, y los menores para las crecidas sobre nitrato 99mM. Los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa dependiente de NADH son siempre superiores a cinco miliunidades, en tanto que para el enzima ligado a NADPH no superan ese valor.

En raíces de plántulas sometidas al mismo tratamiento que en el caso anterior, los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa dependiente de NADH (Figura 23) experimentan un aumento que se mantiene hasta el final del tiempo de tratamiento en el caso de haber crecido sobre nitrato 99mM, al someterlas de nuevo a iluminación con luz blanca; en tanto que las plántulas crecidas sobre nitrato -

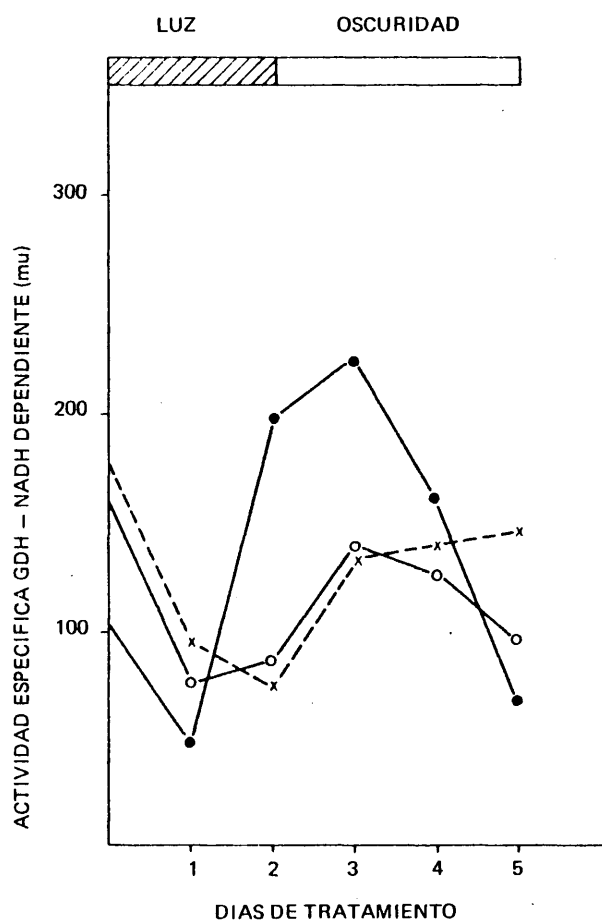


Figura 19.- Actividad específica glutamato deshidrogenasa - dependiente de NADH en raíces de plántulas crecidas durante seis días en oscuridad, sometién-dolas a continuación a dos días de iluminación con luz blanca continua y a tres días de trata-miento oscuro. Las concentraciones de nitrato - utilizadas fueron: 21mM (o—o), 99mM (●—●), y agua (x—x).

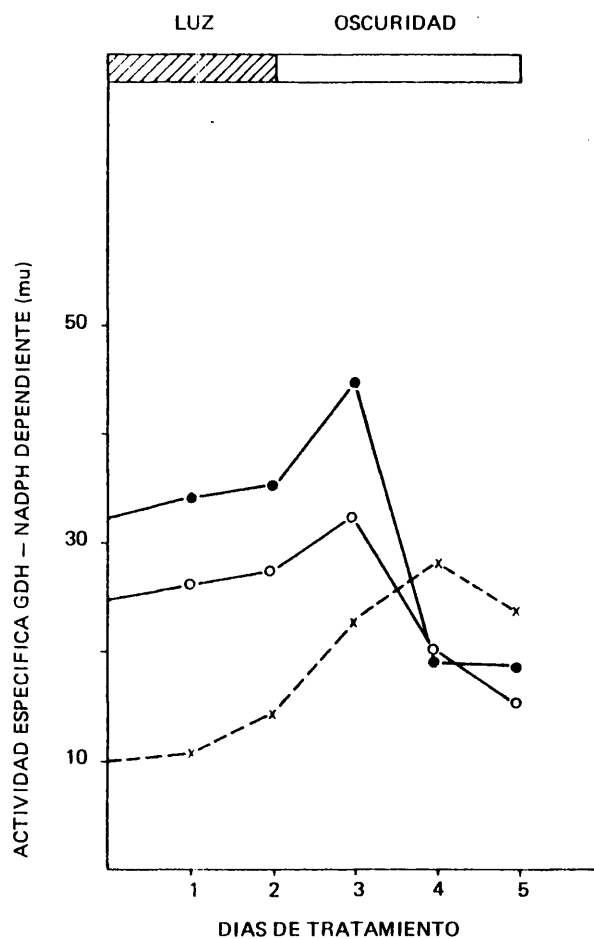


Figura 20.- Actividad específica glutamato deshidrogenasa - dependiente de NADPH en raíces de plántulas crecidas durante seis días en oscuridad, sometién-dolas a dos días de iluminación con luz blanca y a tres días de tratamiento oscuro a continua-ción. Las concentraciones de nitrato utilizadas fueron: 21mM (o—o), 99mM (●—●) y agua (x--x).

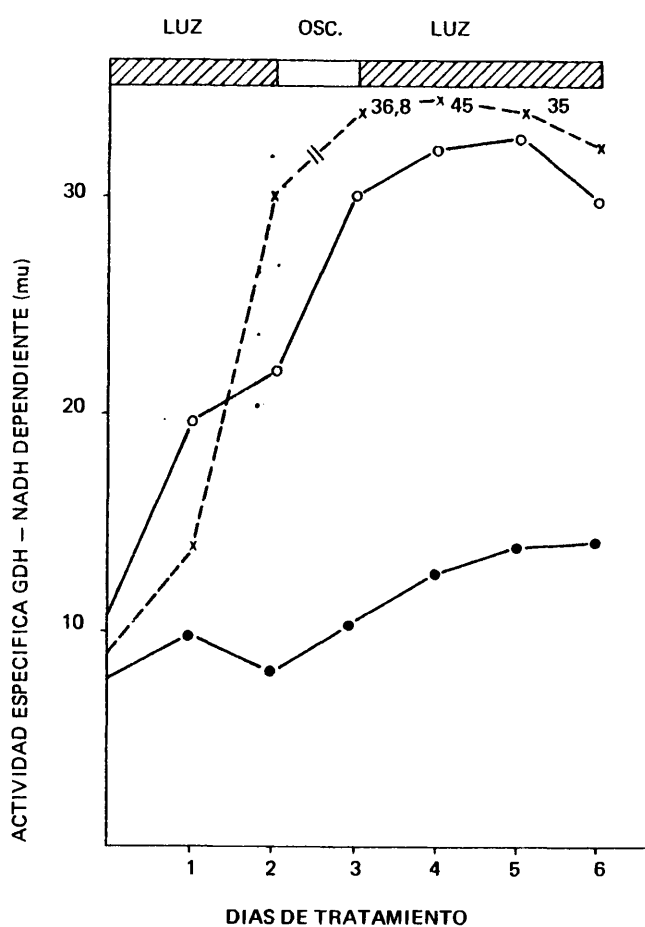


Figura 21.- Actividad específica glutamato deshidrogenasa - dependiente de NADH en cotiledones de plántulas crecidas durante seis días en oscuridad sometidas a tratamiento de luz blanca durante seis días, en el que se intercaló un periodo oscuro de 24 horas entre el segundo y tercer día de tratamiento. Las concentraciones de amonio utilizadas fueron: 21mM (○—○), 99mM (●—●) y -- agua (x---x).

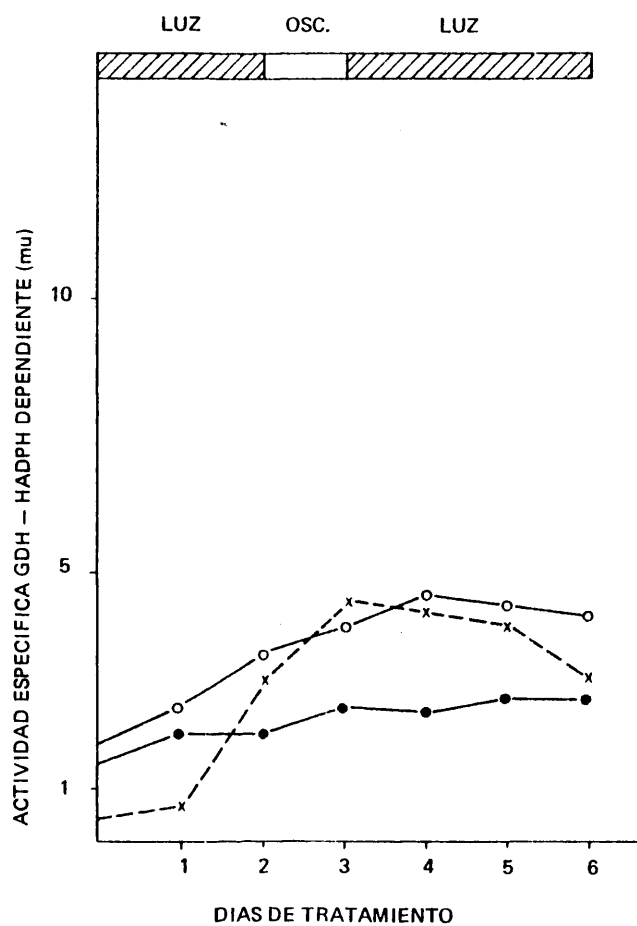


Figura 22.- Actividad específica glutamato deshidrogenasa - dependiente de NADPH en cotiledones de plántulas que habían crecido durante seis días en oscuridad, sometiéndolas a tratamiento de iluminación con luz blanca durante seis días, en el que se intercaló un periodo oscuro de 24 horas entre el segundo y tercer días de tratamiento. Las concentraciones de nitrato utilizadas fueron: 21mM (o—o), 99mM (●—●) y agua (x--x).

21mM y agua sufren un descenso en sus niveles de actividad enzimática hasta el final del tratamiento. Los mayores niveles de actividad glutamato deshidrogenasa dependiente de -- NADH se alcanzan con la concentración más elevada de nitratos. Cuando el enzima utiliza NADPH como cofactor (Figura - 24), el nuevo sometimiento a luz blanca se traduce en un - mantenimiento en los niveles de actividad enzimática, correspondiendo los mayores a la concentración mayor de nitrato - y los menores para el agua, al igual a lo observado para el enzima ligado a NADH pero con niveles de actividad enzimática que no sobrepasan las cincuenta miliunidades.

3.3.2.- Efecto de la luz sobre los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa de plántulas crecidas sobre amonio.

En cotiledones, los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa dependiente de NADH (Figura 25) experimentan un ligero descenso en el primer día de iluminación con luz blanca continua cuando las plántulas crecieron sobre amonio 150 mM, al contrario de lo observado para las crecidas sobre amonio 37mM, que sufren un ligero aumento en el primer día de iluminación con luz blanca, aún así alcanzando los menores niveles de actividad enzimática. Cuando - el enzima utiliza NADPH (Figura 26), los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa se mantienen constantes a lo - largo de todo el tiempo de tratamiento, obteniéndose los mayores niveles de actividad enzimática para las plántulas - crecidas sobre amonio 150mM.

Los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa dependiente de NADH son siempre superiores a cinco miliunidades, en tanto que para el enzima ligado a NADPH no superan nunca ese valor.

En raíces, los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa dependiente de NADH (Figura 27) sufren un drástico aumento durante el primer día de iluminación con luz blanca de plántulas crecidas sobre amonio 37mM, descendiendo a continuación hasta el final del tratamiento; en -- tanto que las plántulas crecidas sobre agua y amonio 150mM experimentan un marcado descenso en los niveles de actividad enzimática durante el primer día de iluminación, descen

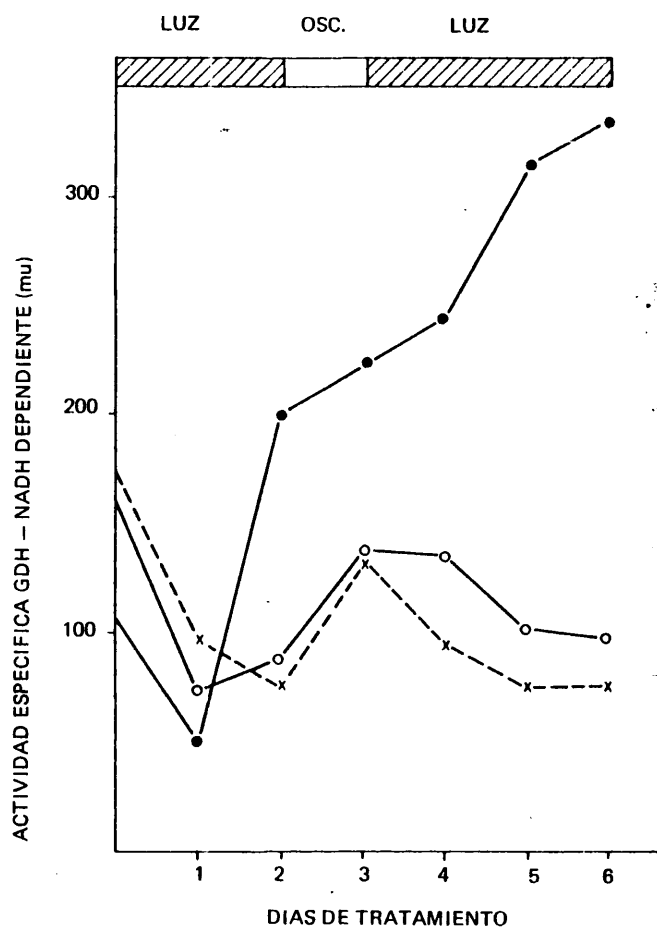


Figura 23.- Actividad específica glutamato deshidrogenasa - dependiente de NADH en raíces de plántulas que habían crecido durante seis días en oscuridad, sometiénolas a tratamiento con luz blanca continua durante seis días, en el que se intercaló un periodo oscuro de 24 horas entre el segundo y tercer días de tratamiento. Las concentraciones de nitrato utilizadas fueron: 21mM (o—o), 99mM (●—●) y agua (x—x).

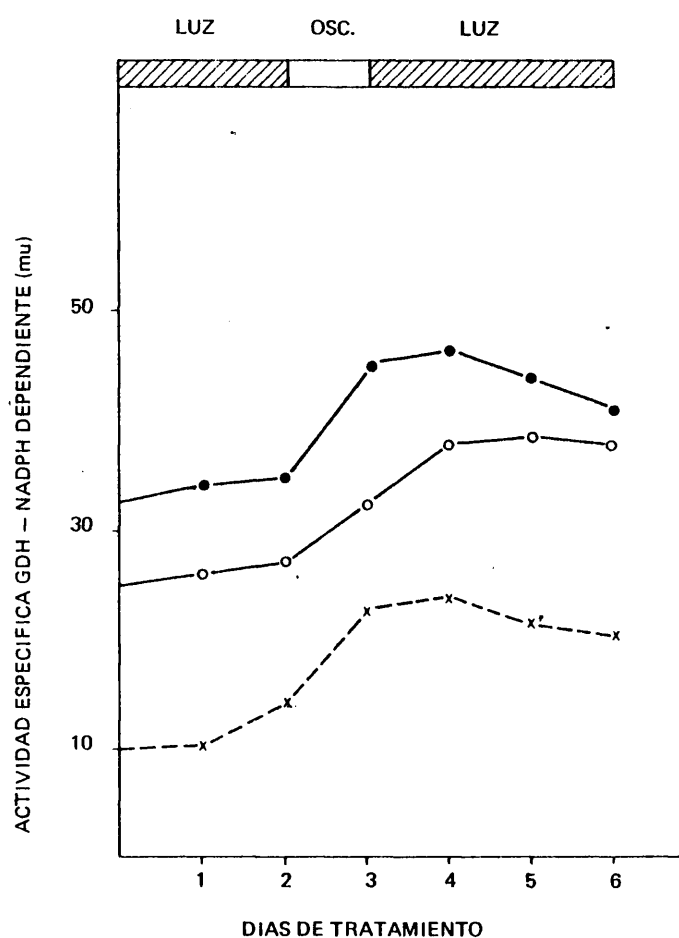


Figura 24.- Actividad específica glutamato deshidrogenasa - dependiente de NADPH en raíces de plántulas crecidas durante seis días en oscuridad, sometién-dolas a continuación a tratamiento con luz blan-ca durante seis días, en el que se intercaló un periodo oscuro de 24 horas entre el segundo y -tercer días de tratamiento. Las concentraciones de nitrato utilizadas fueron: 21mM (o—o), 99mM (●—●) y agua (x--x).

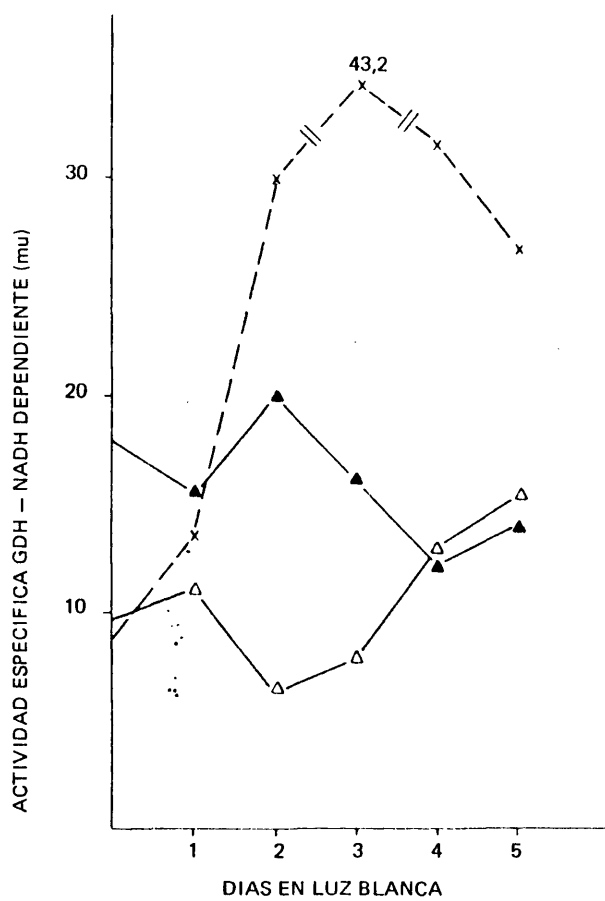


Figura 25.- Actividad específica glutamato deshidrogenasa - dependiente de NADH en cotiledones de plántulas crecidas durante seis días en oscuridad, sometidas a luz blanca continua durante cinco días. - Las concentraciones de amonio utilizadas fueron: 37mM (Δ—Δ), 150mM (▲—▲) y agua (x—x).

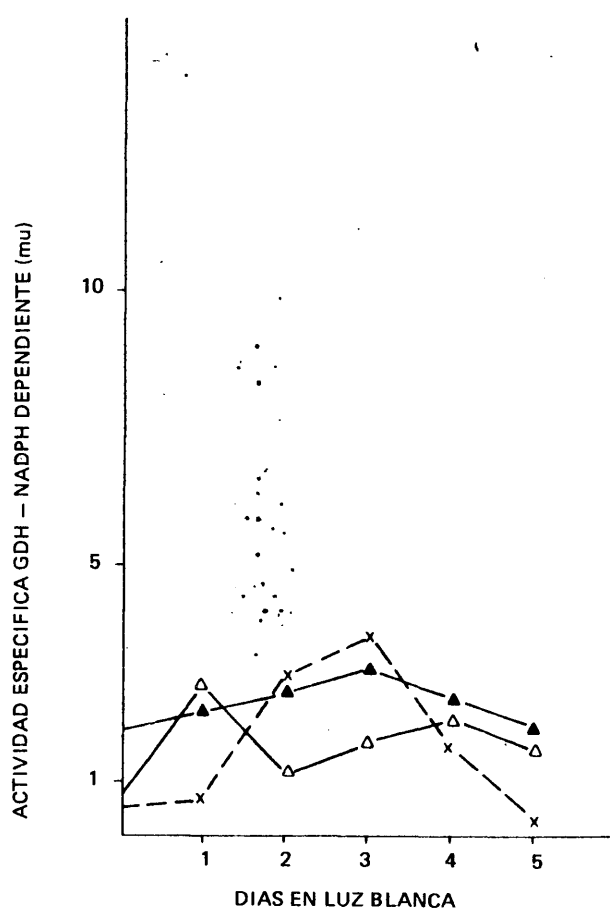


Figura 26.- Actividad específica glutamato deshidrogenasa - dependiente de NADPH en cotiledones de plántulas crecidas durante seis días en oscuridad, sometidas a luz blanca continua durante cinco días. - Las concentraciones de amonio utilizadas fueron: (Δ — Δ), 150mM (\blacktriangle — \blacktriangle) y agua (x—x).

so que se atenúa y mantiene hasta el final del tiempo de experimentación. Los mayores niveles de actividad glutamato - deshidrogenasa dependiente de NADH se obtienen en plántulas crecidas sobre amonio 37mM. Resultados similares, pero menos acentuados se obtienen para el enzima ligado a NADPH -- (Figura 28) aunque los niveles de actividad enzimática alcanzados no superan las treinta miliunidades frente a las cincuenta miliunidades encontradas como mínimo para la glutamato deshidrogenasa que utiliza NADH como cofactor.

En cotiledones, el tratamiento con oscuridad continúa después de dos días de iluminación con luz blanca se traduce en un aumento en los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa dependiente de NADH (Figura 29), -- más marcado para el enzima de plántulas crecidas sobre amonio 150mM donde se alcanzan los mayores niveles de actividad enzimática. Resultados similares se han obtenido para el enzima ligado a NADPH (Figura 30), que alcanza como máximo -- niveles de actividad enzimática de aproximadamente cinco miliunidades frente a las cuarenta y cinco detectadas para el enzima dependiente de NADH.

En raíces (Figura 31), la transferencia de las plántulas a oscuridad después del tratamiento con -- luz blanca provoca un aumento en los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa dependiente de NADH, que más o menos se mantiene hasta el final del tiempo de experimentación, alcanzándose los mayores niveles de actividad enzimática para las plántulas crecidas sobre amonio 37mM. Cuando el enzima utiliza NADPH (Figura 32) el paso de luz a oscuridad se traduce en un aumento en los niveles de actividad enzimática durante los dos primeros días de tratamiento oscuro, descendiendo posteriormente. Los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa ligada a NADH superan las cincuenta miliunidades, en tanto que para el enzima que utiliza -- NADH no excede esa cantidad.

Cuando las plántulas se sometieron a luz blanca continua con un periodo intermedio de oscuridad, los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa dependiente -- de NADH (Figura 33) en cotiledones sufren un ligero aumento, obteniéndose los mayores niveles de actividad enzimática --

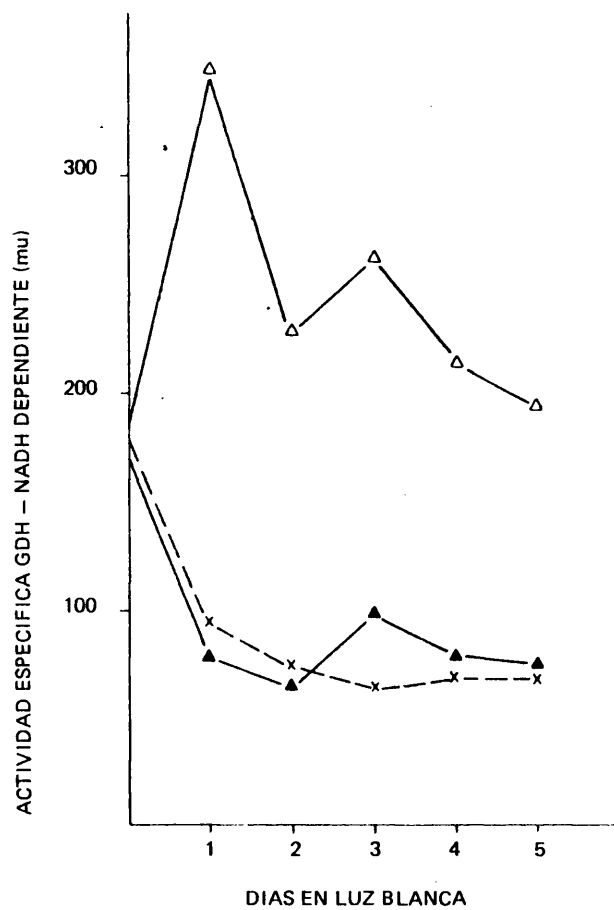


Figura 27.- Actividad específica glutamato deshidrogenasa - dependiente de NADH en raíces de plántulas crecidas en oscuridad, sometidas a luz blanca durante cinco días. Las concentraciones de amonio utilizadas fueron: 37mM (Δ — Δ), 150mM (\blacktriangle — \blacktriangle) y agua (x—x).

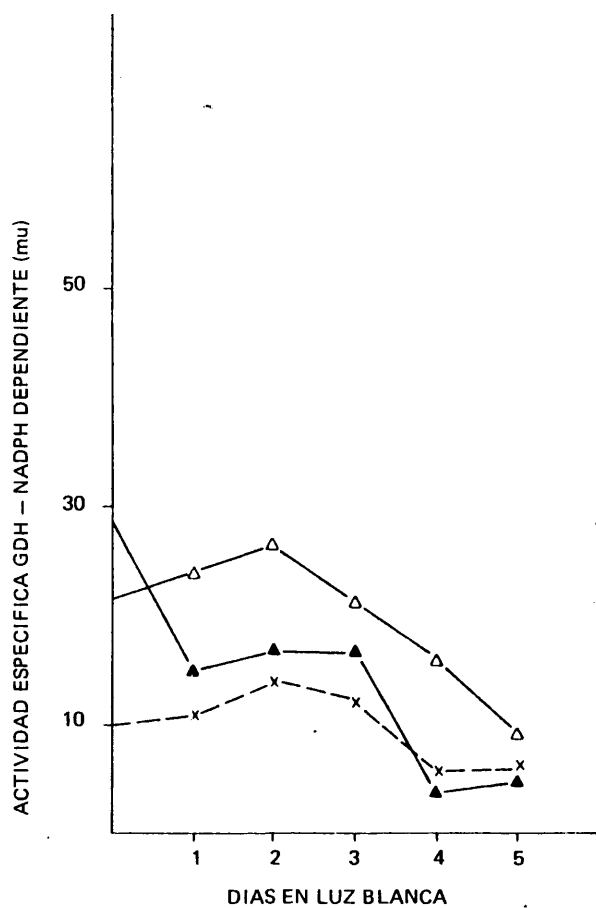


Figura 28.- Actividad específica glutamato deshidrogenasa - dependiente de NADPH en raíces de plántulas crecidas durante seis días en oscuridad, sometidas a luz blanca continua durante cinco días. Las concentraciones de amonio utilizadas fueron: - 37mM (Δ — Δ), 150mM (\blacktriangle — \blacktriangle) y agua (x—x).

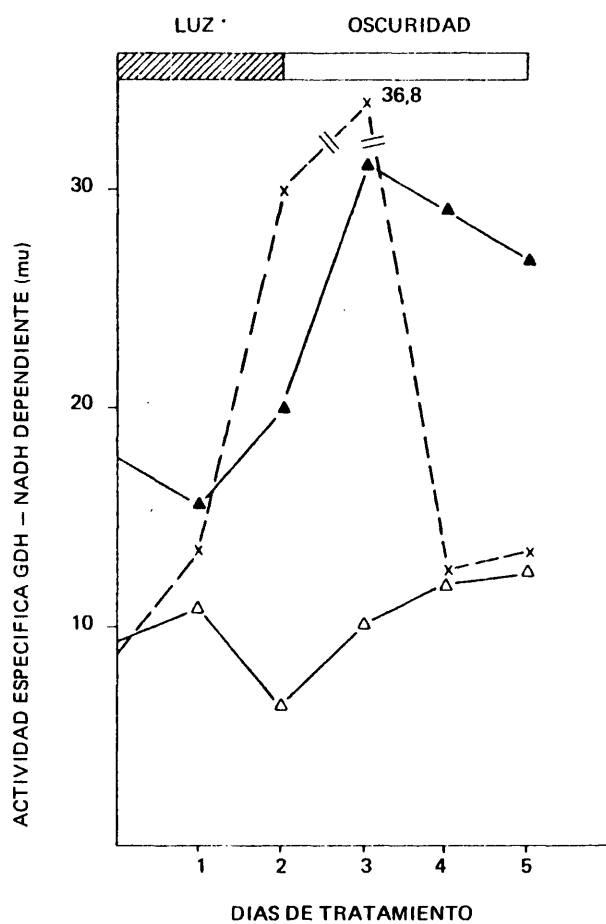


Figura 29.- Actividad específica glutamato deshidrogenasa - dependiente de NADH en cotiledones de plántulas que habían crecido durante seis días en oscuridad, sometiéndolas a dos días de iluminación - con luz blanca y a tres días de tratamiento oscuro a continuación. Las concentraciones de amonio utilizadas fueron: 37mM (Δ — Δ), 150mM -- (\blacktriangle — \blacktriangle) y agua (x—x).

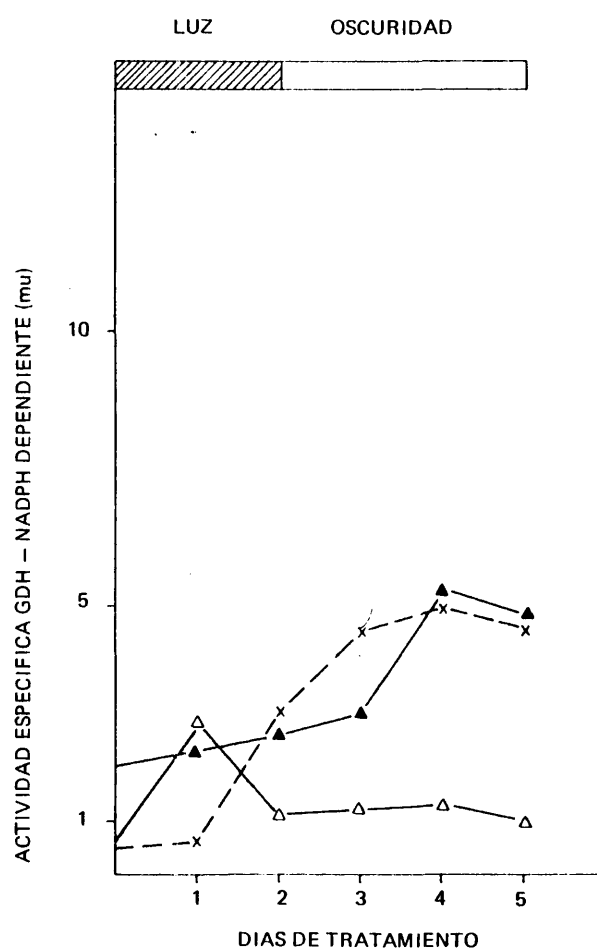


Figura 30.- Actividad específica glutamato deshidrogenasa - dependiente de NADPH en cotiledones de plántulas que habían crecido durante seis días en oscuridad, sometiéndolas a dos días de iluminación con luz blanca y a tres días de tratamiento oscuro a continuación. Las concentraciones de amonio utilizadas fueron: 37mM (Δ — Δ), -- 150mM (\blacktriangle — \blacktriangle) y agua (x—x).

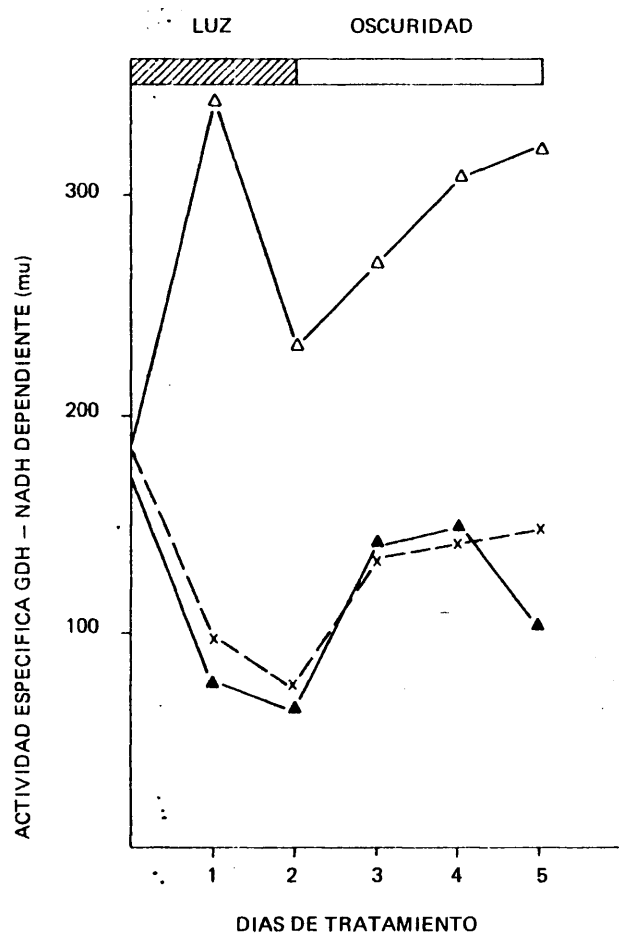


Figura 31.- Actividad específica glutamato deshidrogenasa - dependiente de NADH en raíces de plántulas crecidas durante seis días en oscuridad, sometién-dolas a dos días de iluminación con luz blanca y a tres días de tratamiento oscuro a continua-ción. Las concentraciones de amonio utilizadas fueron: 37mM (Δ — Δ), 150mM (\blacktriangle — \blacktriangle) y agua -- (x—x).

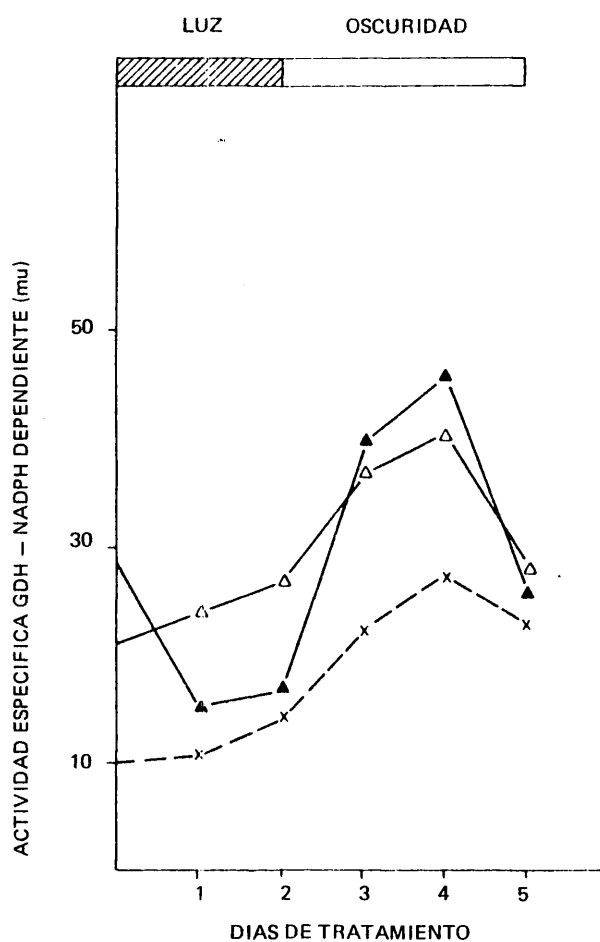


Figura 32.- Actividad específica glutamato deshidrogenasa - dependiente de NADPH en raíces de plántulas crecidas durante seis días en oscuridad, sometiéndolas a continuación a dos días de iluminación - con luz blanca y a tres días de tratamiento os-curo. Las concentraciones de amonio utilizadas fueron: 37mM (Δ—Δ), 150mM (▲—▲) y agua -- (x---x).

para la mayor concentración de amonio utilizada. Resultados similares se obtuvieron para el enzima que utiliza NADPH -- (Figura 34), aunque no sobrepasan las cinco miliunidades en tanto que para el enzima ligado a NADH eran siempre superiores.

En raices, los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa dependiente de NADH (Figura 35) sufren un marcado descenso cuando plántulas crecidas sobre -- agua y amonio 150mM se sometieron de nuevo a iluminación -- con luz blanca continua, mientras que las plántulas que crecieron sobre amonio 37mM sufren un ligero aumento para descender a continuación, alcanzando los mayores niveles de actividad enzimática. Los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa dependiente de NADPH (Figura 36) se mantienen -- más o menos constantes, a lo largo de todo el tiempo de tratamiento, en plántulas crecidas sobre agua y amonio 37mM -- donde se alcanzan los mayores niveles de actividad enzimática, en tanto que las crecidas sobre amonio 150mM sufren un descenso al someterlas de nuevo a iluminación con luz blanca continua.

Los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa dependiente de NADH en raices son del orden de -- trescientas miliunidades, mientras que el enzima ligado a -- NADPH presenta como máximo niveles de actividad enzimática del orden de cuarenta miliunidades.

Independientemente del tipo de tratamiento luminoso al que se sometieron las plántulas, los mayores niveles de actividad glutamato deshidrogenasa dependiente -- de NADH se alcanzaron en raices (del orden de trescientas -- miliunidades) frente a los encontrados en cotiledones del -- orden de cuarenta y cinco miliunidades como máximo). De -- igual manera, los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa dependiente de NADPH presentados en cotiledones son -- siempre inferiores a los encontrados en raices, del orden -- de cinco miliunidades como máximo en los primeros, y de cuarenta miliunidades como máximo en las segundas.

3.4.- Influencia de la luz sobre los niveles de actividad -- glutamina sintetasa.

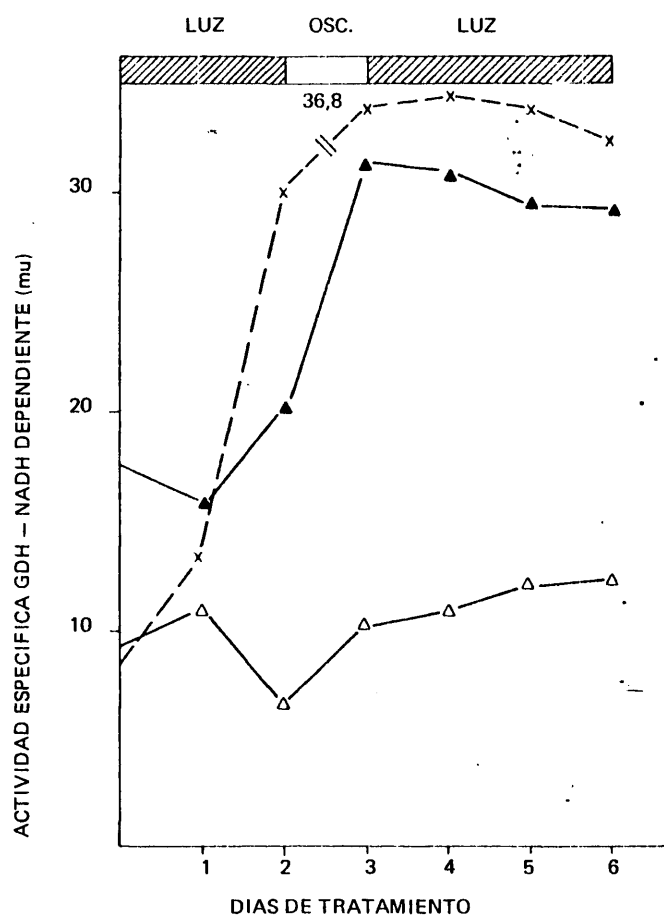


Figura 33.- Actividad específica glutamato deshidrogenasa - dependiente de NADH en cotiledones de plántulas que habían crecido durante seis días en oscuridad, sometiéndolas a tratamiento de iluminación con luz blanca durante seis días, en el que se intercaló un periodo oscuro de 24 horas entre el segundo y tercer días de tratamiento. Las concentraciones de amonio utilizadas fueron: -- 37mM (Δ — Δ), 150mM (\blacktriangle — \blacktriangle) y agua (x—x).

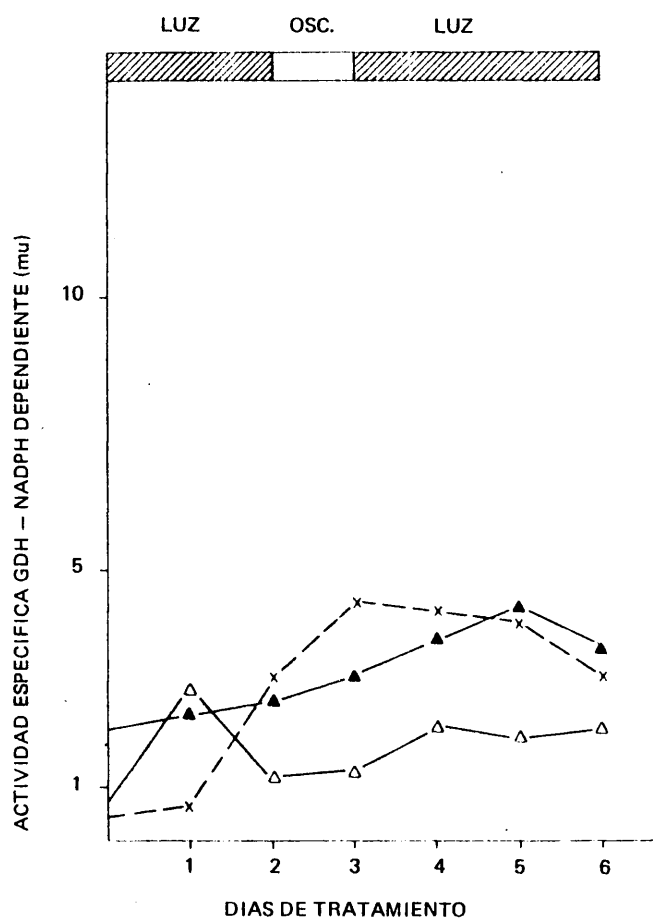


Figura 34.- Actividad específica glutamato deshidrogenasa - dependiente de NADPH en cotiledones de plántulas crecidas durante seis días en oscuridad, sometiendo a tratamiento de iluminación con luz blanca durante seis días, en el que se intercaló un periodo oscuro de 24 horas entre el segundo y tercer días de tratamiento. Las concentraciones de amonio utilizadas fueron: 37mM (Δ — Δ), 150mM (\blacktriangle — \blacktriangle) y agua (x—x).

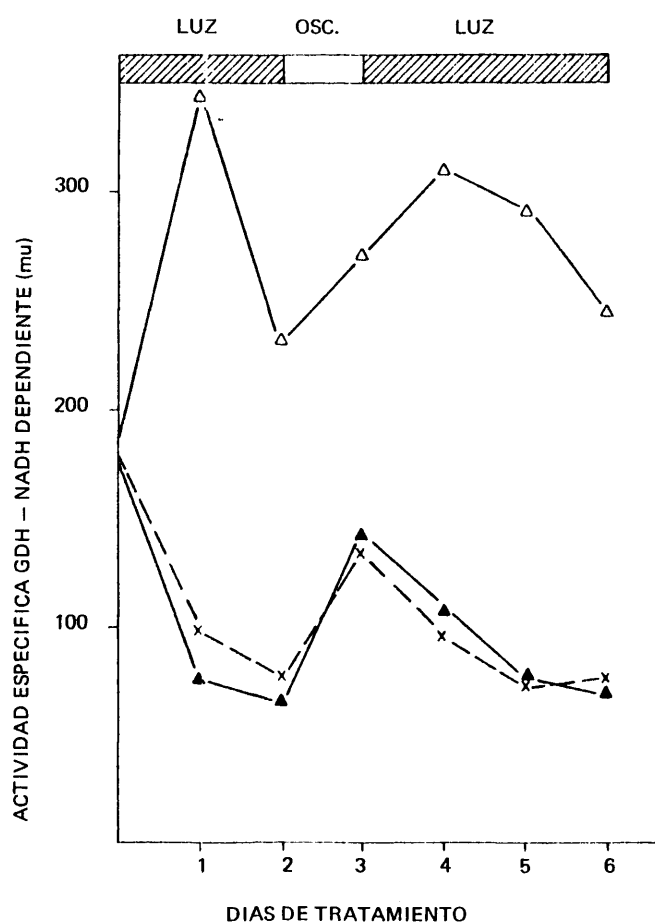


Figura 35.- Actividad específica glutamato deshidrogenasa - dependiente de NADH en raíces de plántulas crecidas durante seis días en oscuridad, sometién-dolas a continuación a tratamiento de ilumina-ción con luz blanca durante seis días, en el - que se intercaló un periodo oscuro de 24 horas entre el segundo y tercer días de tratamiento. Las concentraciones de amonio utilizadas fueron: 37mM (Δ—Δ), 150mM (▲—▲) y agua (x---x).

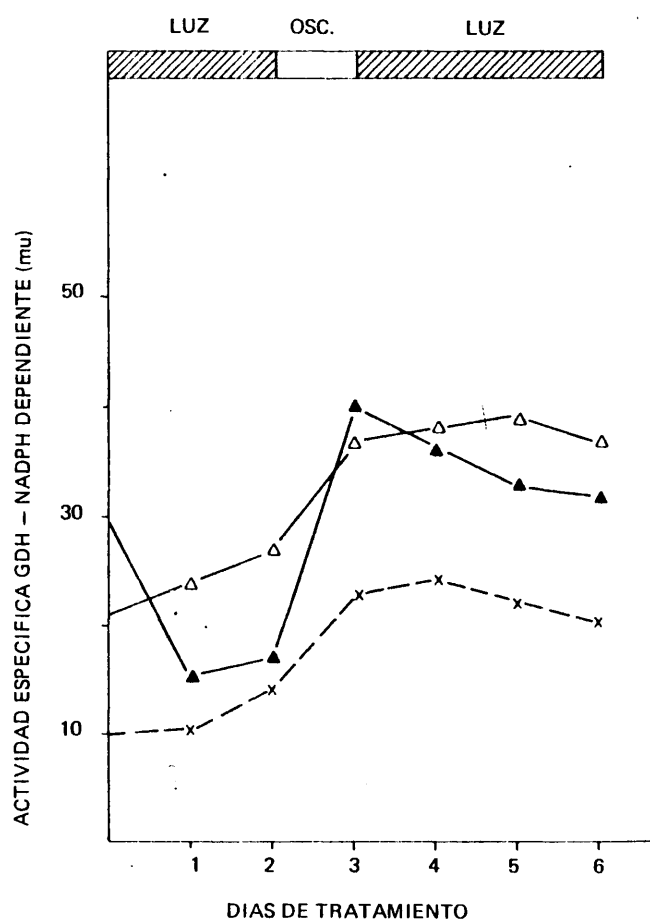


Figura 36.- Actividad específica glutamato deshidrogenasa - dependiente de NADPH en raíces de plántulas crecidas durante seis días en oscuridad, sometién-dolas a continuación a tratamiento de ilumina-ción con luz blanca durante seis días en el que se intercaló un periodo oscuro de 24 horas en-tre el segundo y tercer días de tratamiento. Las concentraciones de amonio utilizadas fueron: -- 37mM (Δ—Δ), 150mM (▲—▲) y agua (x—x).

Se han estudiado los niveles de actividad glutamina sintetasa en plántulas de Citrullus vulgaris siguiendo el mismo protocolo al descrito para la glutamato deshidrogenasa en el apartado 3.3.

3.4.1.- Efecto de la luz sobre los niveles de actividad glutamina sintetasa en plántulas crecidas sobre nitrato.

En cotiledonés, los niveles de actividad glutamina sintetasa (Figura 37) sufren un drástico aumento durante el primer día de iluminación con luz blanca continua, descendiendo marcadamente al segundo día, a partir del cual se mantienen más o menos los niveles de actividad enzimática hasta el final del tiempo de experimentación. Los mayores niveles de actividad glutamina sintetasa alcanzados corresponden a la mayor concentración de nitratos.

En raíces, los niveles de actividad glutamina sintetasa (Figura 38) experimentan un ligero descenso en el primer día de iluminación con luz blanca continua, a partir del cual se mantienen para las plántulas crecidas sobre nitrato 21mM, aumentan para las crecidas sobre nitrato 99mM, donde alcanzan los mayores niveles de actividad enzimática, y disminuyen ligeramente en plántulas crecidas sobre agua.

Los niveles de actividad glutamato sintetasa detectados en cotiledones no superan en gran medida las 0,1 unidades, en tanto que los encontrados en raíces oscilan entre 0,1 y 0,5 unidades.

El tratamiento de oscuridad después de dos días de iluminación con luz blanca se traduce en los cotiledones (Figura 39) en un descenso en los niveles de actividad glutamina sintetasa, obteniéndose al final del tiempo de tratamiento niveles de actividad enzimática similares para las dos concentraciones de nitrato utilizadas. En raíces, los niveles de actividad glutamina sintetasa (Figura 40) experimentan un ligero aumento al someterlas a oscuridad, siendo este más marcado para el nitrato 99mM donde a la vez se alcanzan los mayores niveles de actividad enzimática.

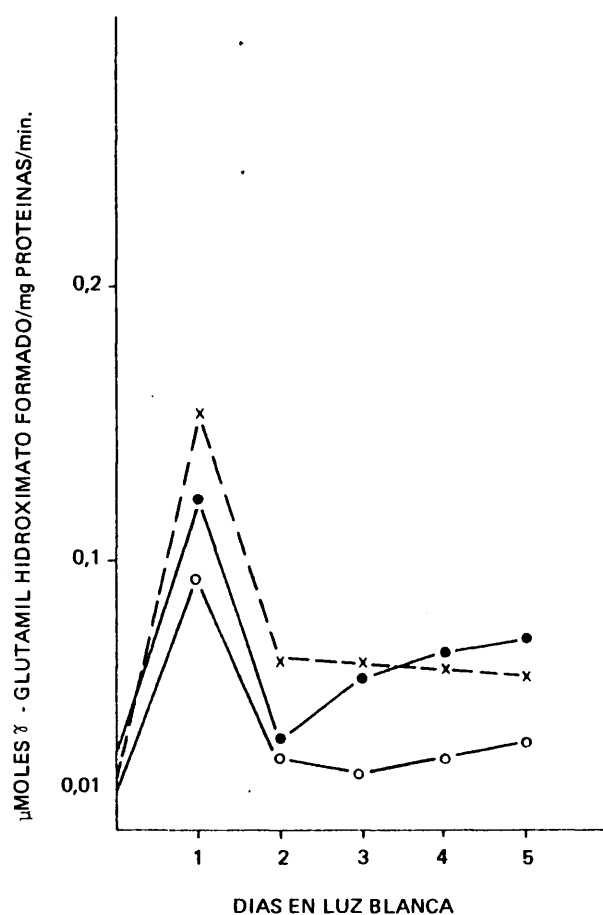


Figura 37.- Actividad específica glutamina sintetasa en cotiledones de plántulas crecidas durante seis días en oscuridad, sometidas a luz blanca continua durante cinco días. Las concentraciones de nitrato utilizadas fueron: 21mM (o—o), 99mM (●—●) y agua (x—x).

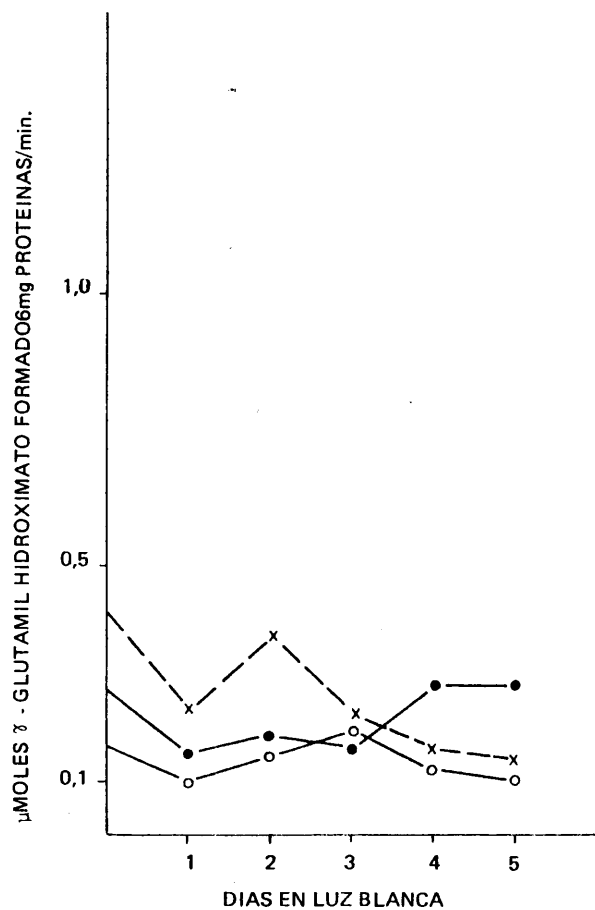


Figura 38.- Actividad específica glutamina sintetasa en raíces de plántulas crecidas durante seis días en oscuridad, sometidas a luz blanca continua durante cinco días. Las concentraciones de nitrato utilizadas fueron: 21mM (o—o), 150mM (●—●) y agua (x--x).

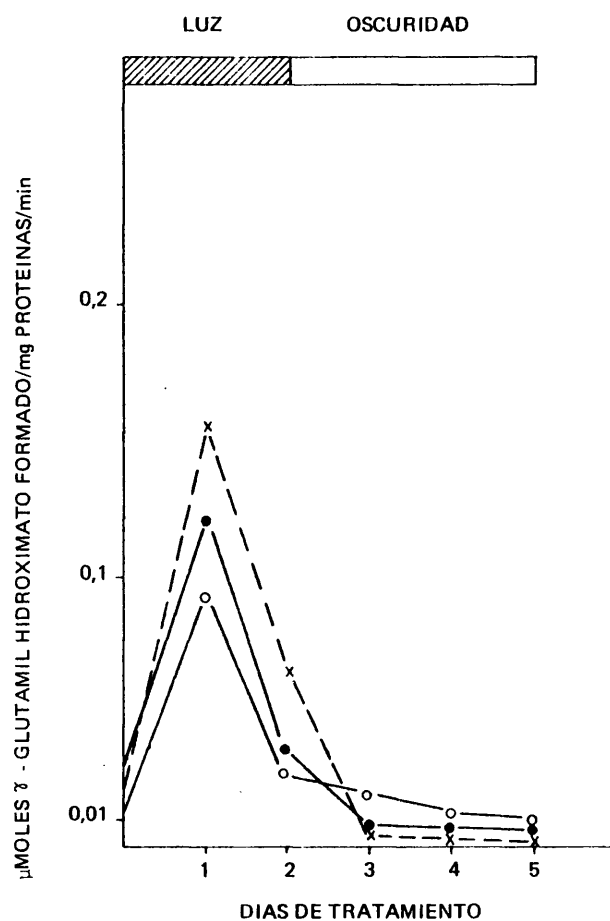


Figura 39.- Actividad específica glutamina sintetasa en cotiledones de plántulas crecidas durante seis días en oscuridad, sometiénolas a dos días de iluminación con luz blanca y a tres días de tratamiento oscuro a continuación. Las concentraciones de nitrato utilizadas fueron: 21mM (o—o), 99mM (●—●) y agua (x---x).

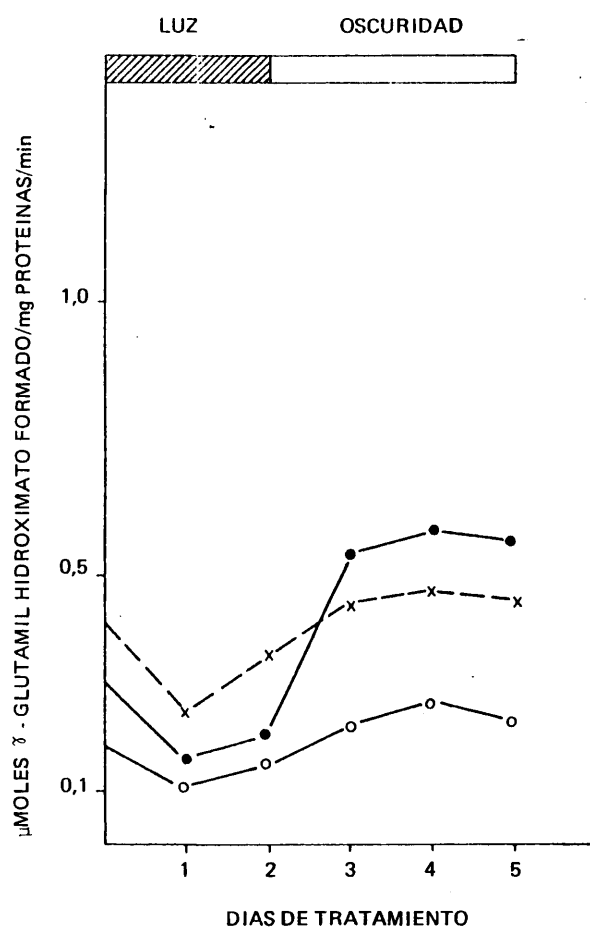


Figura 40.- Actividad específica glutamina sintetasa en raíces de plántulas crecidas durante seis días en oscuridad, sometiénolas a dos días de iluminación con luz blanca y a tres días de tratamiento oscuro a continuación. Las concentraciones de nitrato utilizadas fueron: 21mM (o—o), 99mM (●—●) y agua (x—x).

El sometimiento de las plántulas a luz blanca continua después de un día en oscuridad, se traduce en los cotiledones (Figura 41) en un descenso en los niveles de actividad glutamina sintetasa, obteniéndose los mayores niveles de actividad enzimática para la concentración más elevada de nitrato. En raíces (Figura 42), a partir del tercer día de tratamiento se observa un drástico descenso en los niveles de actividad glutamina sintetasa de plántulas crecidas sobre nitrato 99mM, mientras que para las plántulas crecidas sobre agua y nitrato 21mM se mantienen a lo largo de todo el tiempo de experimentación.

Independientemente del tipo de tratamiento luminoso, los niveles de actividad glutamina sintetasa alcanzados en cotiledones son inferiores a los detectados en raíces, del orden de 0,15 unidades como máximo para los primeros, y superiores a ese valor en las segundas.

3.4.2.- Efecto de la luz sobre los niveles de actividad glutamina sintetasa en plantas crecidas sobre amonio.

En cotiledones, los niveles de actividad glutamina sintetasa (Figura 43) experimentan un drástico aumento durante el primer día de iluminación con luz blanca, disminuyendo marcadamente al segundo día de tratamiento, a partir del cual se mantienen los niveles de actividad enzimática. Los mayores niveles de actividad enzimática corresponden a la menor concentración de amonio.

En raíces (Figura 44), la luz blanca continua provoca durante el primer día de iluminación un drástico aumento en los niveles de actividad glutamato sintetasa de plántulas crecidas sobre amonio 37mM, y menos marcado en las crecidas sobre amonio 150mM, descendiendo a partir de entonces hasta el final del tratamiento. Los mayores niveles de actividad enzimática corresponden a la menor concentración de amonio.

El tratamiento de oscuridad después de dos días de iluminación con luz blanca continua se traduce en los cotiledones (Figura 45) en un descenso generalizado de los niveles de actividad glutamato sintetasa: obteniéndose los mayores niveles de actividad enzimática para el amo-

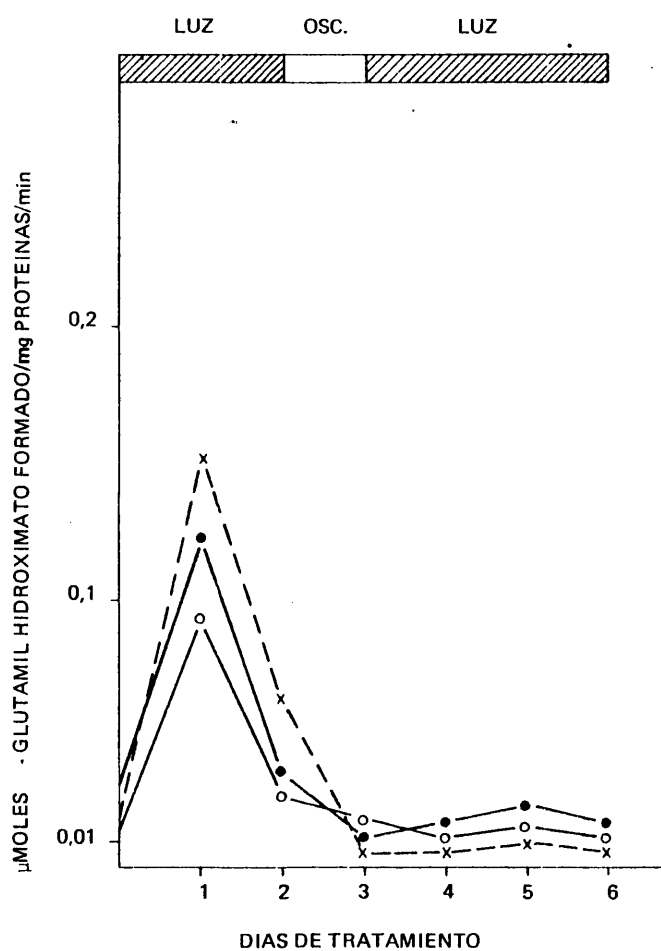


Figura 41.- Actividad específica glutamina sintetasa en cotiledones de plántulas que habían crecido durante seis días en oscuridad, sometiéndolas a continuación a tratamiento de iluminación con luz blanca durante seis días, en el que se intercaló un periodo oscuro de 24 horas entre el segundo y tercer días de tratamiento. Las concentraciones de nitrato utilizadas fueron: 21mM (o—o), 99mM (●—●) y agua (x—x).

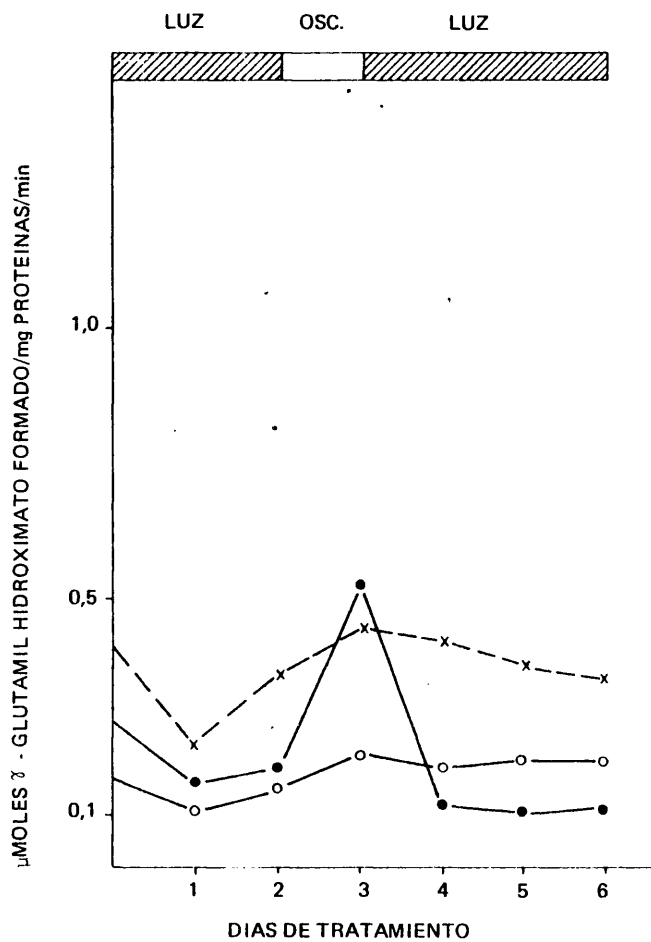


Figura 42.- Actividad específica glutamina sintetasa en raíces de plántulas que habían crecido durante seis días en oscuridad, sometiénolas a tratamiento de iluminación con luz blanca durante seis días, en el que se intercaló un periodo oscuro de 24 horas entre el segundo y tercer días de tratamiento. Las concentraciones de nitrato utilizados fueron: 21mM (○—○), 99mM (●—●) y agua (x---x).

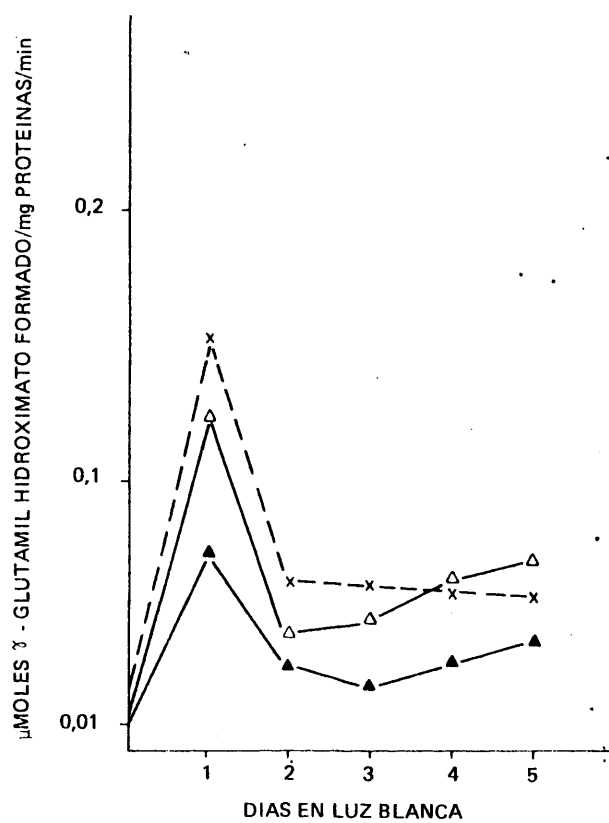


Figura 43.- Actividad específica glutamina sintetasa en cotiledones de plántulas crecidas durante seis días en oscuridad, sometidas a iluminación con luz blanca continua durante cinco días. Las concentraciones de amonio utilizadas fueron: 37mM (Δ — Δ), 150mM (\blacktriangle — \blacktriangle) y agua (x—x).

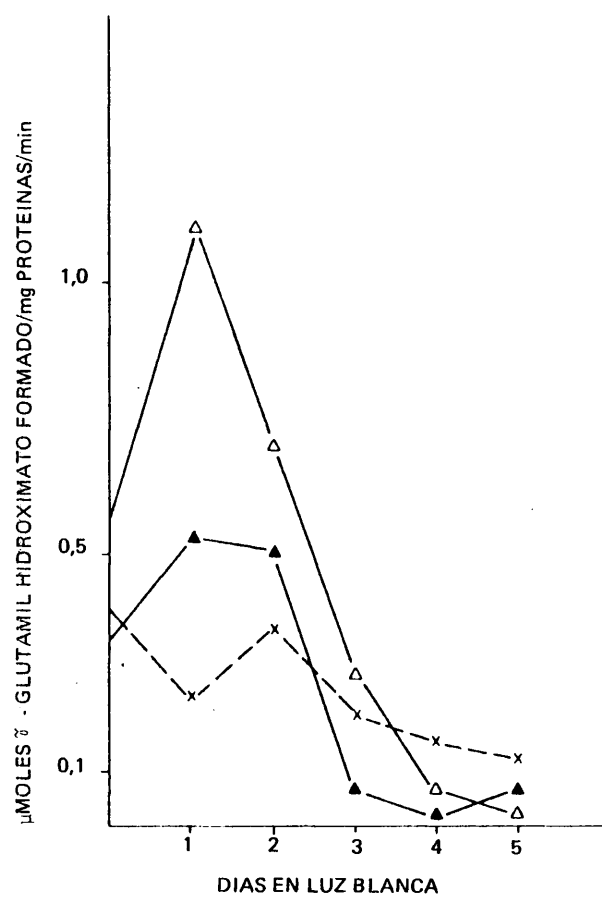


Figura 44.- Actividad específica glutamina sintetasa en raíces de plántulas crecidas durante seis días en oscuridad, sometidas a iluminación con luz blanca continua durante cinco días. Las concentraciones de amonio utilizadas fueron: 37mM (Δ—Δ), 150mM (▲—▲) y agua (x---x).

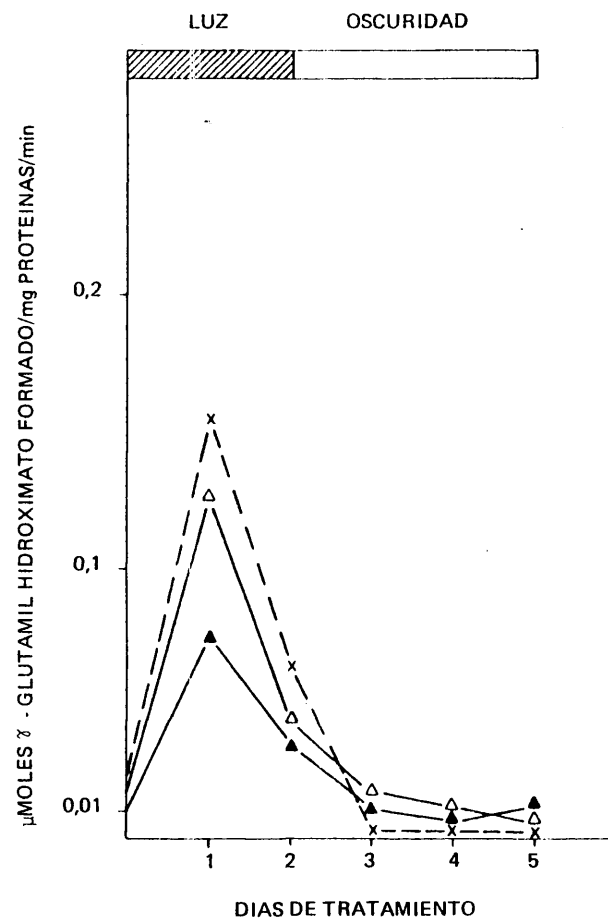


Figura 45.- Actividad específica glutamina sintetasa en cotiledones de plántulas que habían crecido durante seis días en oscuridad, sometiénolas a dos días de iluminación con luz blanca y a tres días de tratamiento oscuro. Las concentraciones de amonio utilizadas fueron: 37mM (Δ — Δ), 150mM (\blacktriangle — \blacktriangle) y agua (x—x).

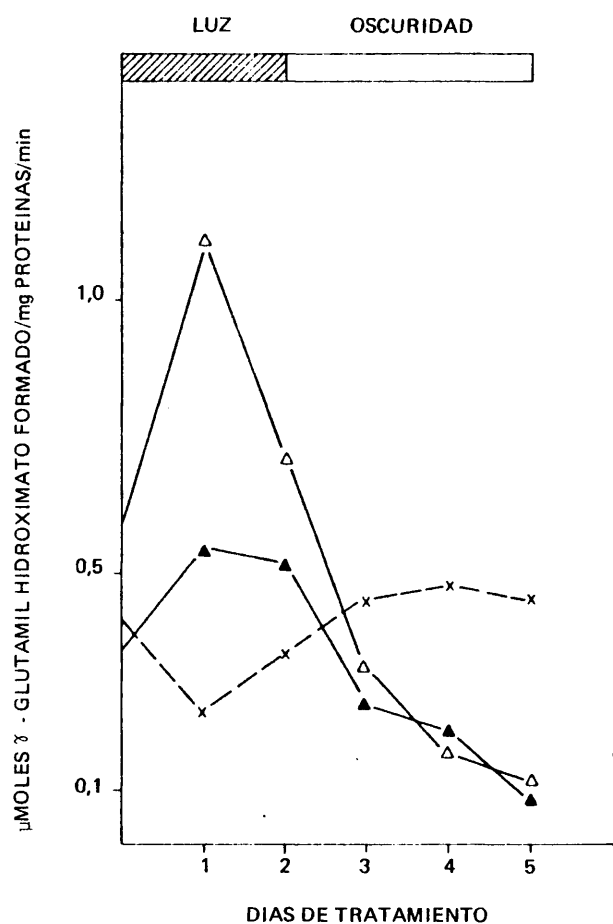


Figura 46.- Actividad específica glutamina sintetasa en raíces de plántulas crecidas durante seis días en oscuridad, sometiéndolas a dos días de iluminación con luz blanca y a tres días de tratamiento oscuro a continuación. Las concentraciones de amonio utilizadas fueron: 37mM (Δ—Δ), 150mM (▲—▲) y agua (x---x).

nio 37mM. Resultados similares se obtuvieron en raíces (Figura 46).

El sometimiento de las plántulas a luz blanca continua después de un día en oscuridad provoca en los cotiledones (Figura 47) un ligero aumento en los niveles de actividad glutamina sintetasa, obteniéndose los mayores niveles de actividad enzimática al final del tratamiento, para la concentración más baja de amonio. En raíces (Figura 48), la luz se traduce en un ligero aumento en los niveles de actividad glutamina sintetasa de plántulas crecidas sobre agua y amonio 37mM, en tanto que aumenta ligeramente los niveles de actividad enzimática para la concentración más elevada de amonio.

Independientemente del tipo de tratamiento luminoso utilizado, los niveles de actividad enzimática alcanzados en cotiledones, como máximo, son 0,15 unidades; en tanto que en raíces oscilan entre 0,1 y 1,2 unidades.

3.5.- Electroforesis de la glutamato deshidrogenasa.

El estudio de los zimogramas de la glutamato deshidrogenasa se realizó para todos los medios nitrogenados utilizados, sobre los órganos de plántulas crecidas durante seis días en oscuridad y sobre aquellas que al sexto día de tratamiento oscuro se transfirieron a iluminación con luz blanca continua durante periodos de 48 y 72 horas. También se llevó a cabo la electroforesis de la semilla completa después del periodo de imbibición.

Para la glutamato deshidrogenasa dependiente de NADH (Figura 49), en la semilla completa aparece una única banda isoenzimática (b) cuyo valor de Rf es $0,10 \pm 0,01$. Después de seis días de tratamiento oscuro, aparecen bandas isoenzimáticas comunes (a y b) cuyos valores de Rf son $0,06 \pm 0,01$ y $0,10 \pm 0,01$ para los cotiledones de plántulas crecidas tanto sobre agua como sobre nitratos o amonio, presentando una tercera banda de formazán distinta dependiendo del medio nitrogenado sobre el que crecieron. En este sentido, se detecta una banda isoenzimática (d) con un valor de Rf de $0,17 \pm 0,01$ en las crecidas sobre agua y nitrato 21mM, desapareciendo al aumentar la concentración

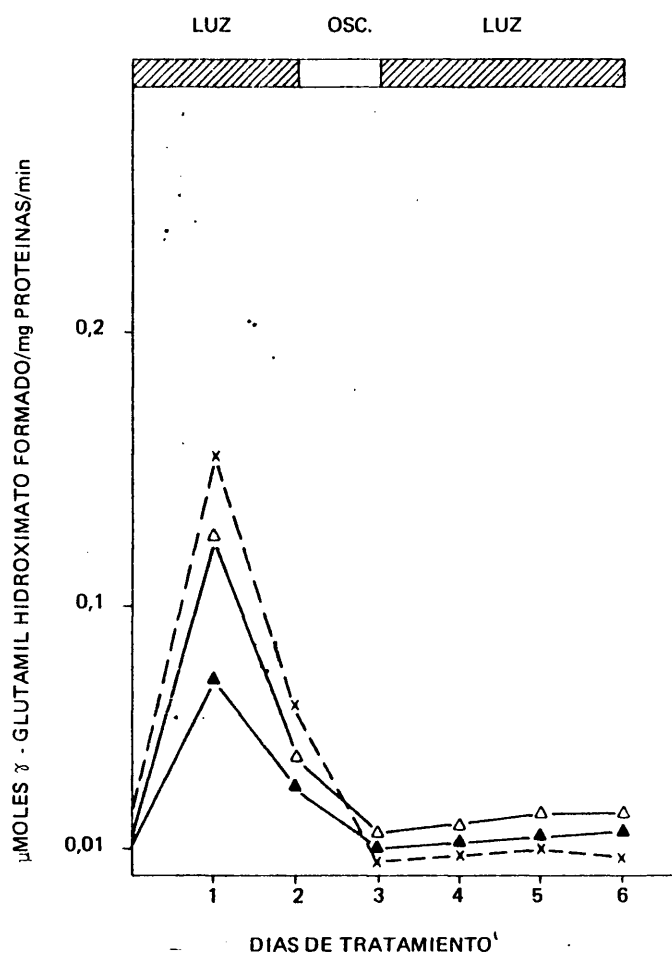


Figura 47.- Actividad específica glutamina sintetasa en cotiledones de plántulas que habían crecido durante seis días en oscuridad, sometiéndolas a tratamiento de iluminación con luz blanca durante seis días, en el que se intercaló un periodo oscuro de 24 horas entre el segundo y el tercer días de tratamiento. Las concentraciones de amonio utilizadas fueron:
37mM (Δ—Δ), 150mM (▲—▲) y agua (x---x).

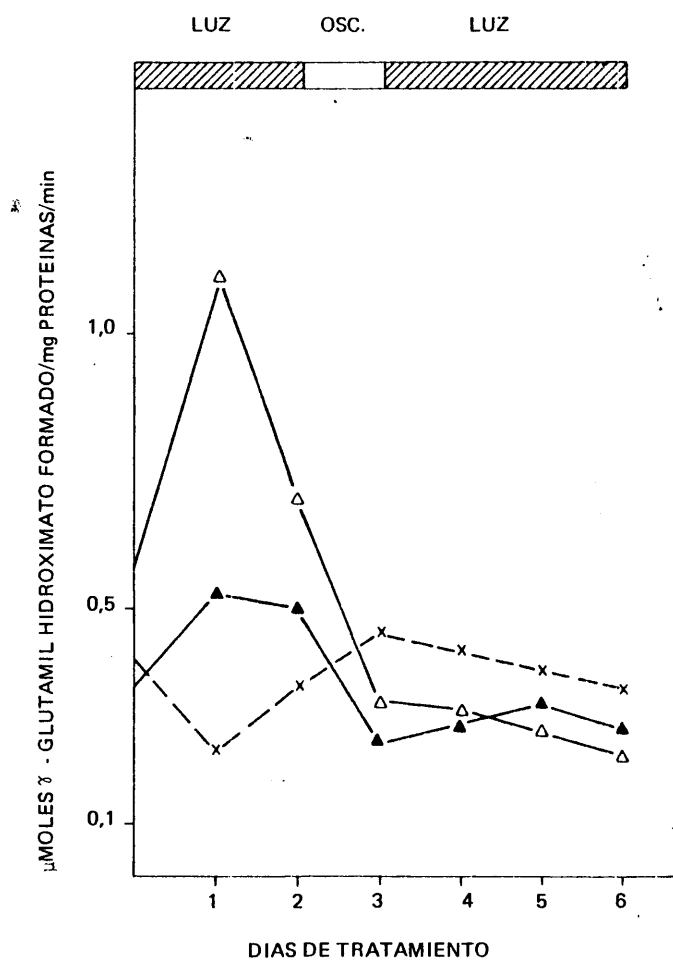


Figura 48.- Actividad específica glutamina sintetasa en raíces de plántulas crecidas durante seis días en oscuridad, sometiénolas a continuación a tratamiento de iluminación con luz blanca durante seis días, en el que se intercaló un periodo oscuro de 24 horas entre el tercer y segundo días de tratamiento. Las concentraciones de amonio utilizadas fueron: 37mM (Δ—Δ), 150mM (▲—▲) y agua (x---x).

de nitrato. Cuando era amonio el medio nitrogenado utilizado, se detectó la aparición de una nueva deposición de formazán (f) con un valor de Rf de $0,25 \pm 0,01$. En raíces, independientemente del medio nutritivo, se detectan tres isoenzimas comunes: b, c y e cuyos valores de Rf son respectivamente $0,10 \pm 0,01$, $0,14 \pm 0,01$ y $0,20 \pm 0,01$, observándose la aparición de nuevas bandas isoenzimáticas adicionales en raíces de plántulas crecidas sobre amonio: la banda isoenzimática f en el caso de la menor concentración de amonio, y -- las bandas de formazán f, g y h con valores de Rf respectivamente de $0,25 \pm 0,01$, $0,27 \pm 0,01$ y $0,30 \pm 0,01$ cuando crecieron sobre amonio 150mM.

Cuando el enzima utiliza NADP como cofactor (Figura 50), en la semilla completa aparece una única -- banda isoenzimática (a) con un Rf de $0,06 \pm 0,01$, banda que -- se mantiene hasta el sexto día de crecimiento en oscuridad, en cotiledones de plántulas crecidas sobre agua y nitratos. Para los cotiledones de plántulas crecidas sobre amonio, -- esta banda isoenzimática es sustituida por la banda isoenzimática b cuando crecieron sobre amonio 150mM. En raíces, la banda isoenzimática detectada en agua (c) con un Rf de -- $0,14 \pm 0,01$ (distinta a la obtenida en cotiledones) difiere -- de las obtenidas sobre nitratos (b) tanto 21mM como 99mM -- con un Rf de $0,10 \pm 0,01$. A medida que aumenta la concentración de amonio aparece una nueva banda isoenzimática hasta un total de tres en el caso de amonio 150mM, siendo sus valores de Rf: $0,10 \pm 0,01$ (b), $0,14 \pm 0,01$ (c) y $0,10 \pm 0,01$ (d).

La luz blanca se traduce en la desaparición progresiva de bandas isoenzimáticas de la glutamato -- deshidrogenasa dependiente de NADH (Figura 51). En cotiledo -- nes de plántulas crecidas sobre agua o nitratos, después de -- tres días de iluminación con luz blanca, permanece una única banda isoenzimática (b) de Rf $0,10 \pm 0,01$; en tanto que para los cotiledones de plántulas crecidas sobre amonio 150mM se detectan dos bandas de formazán (a y b) de Rf respectivamente $0,06 \pm 0,01$ y $0,10 \pm 0,01$. En raíces, se observa una única -- banda isoenzimática (c) para las crecidas sobre nitratos, -- y una banda de menor Rf para las crecidas sobre agua. Para el amonio, permanece la banda b, salvo para la mayor concen --

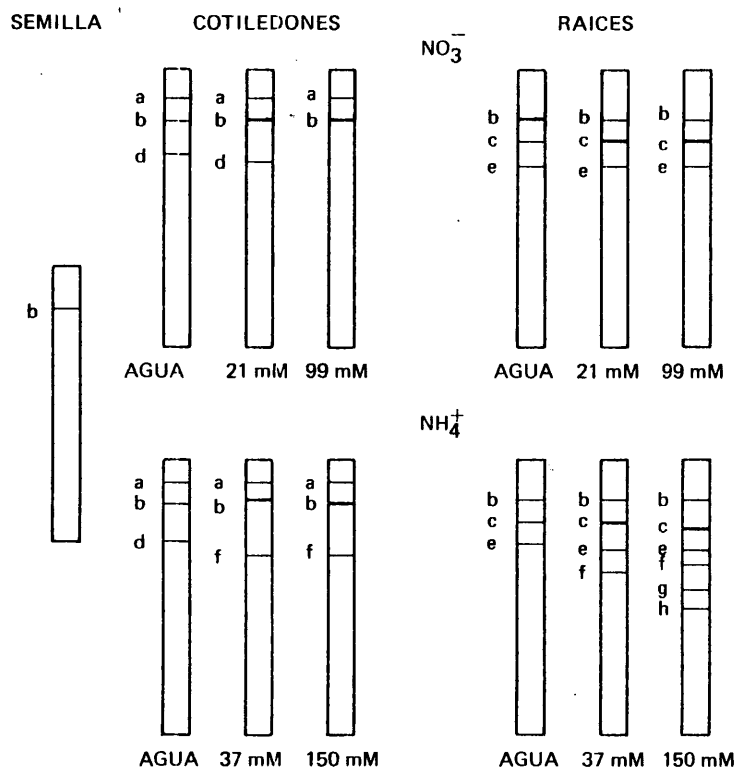


Figura 49.- Electroforesis en gel de poliacrilamida de la - glutamato deshidrogenasa dependiendo de NADH de cotiledones y raices de plántulas crecidas durante seis días en oscuridad sobre agua y distintas concentraciones de nitrato o amonio. Los valores de Rf son: a= 0,6±0,01, b= 0,10±0,01, c= 0,14±0,01, d= 0,17±0,01, e= 0,2±0,01, f= 0,24 ±0,01, g= 0,27±0,01 y h= 0,30±0,01.

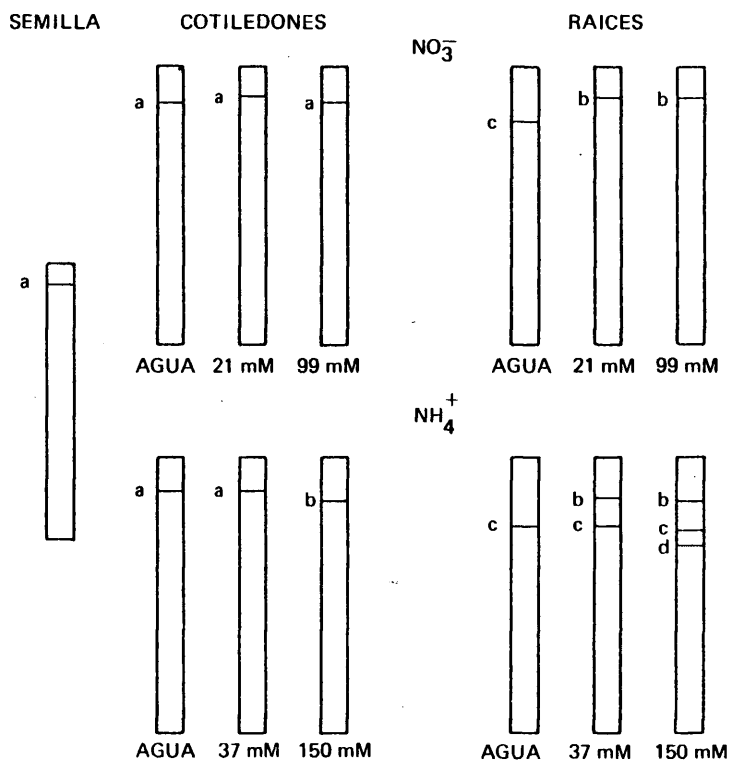


Figura 50.- Electroforesis en gel de poliacilamida de la glutamato deshidrogenasa dependiente de NADPH - en cotiledones y raices de plántulas crecidas - durante seis días en oscuridad continua sobre - agua y distintas concentraciones de nitrato y - amonio. Los valores de Rf son: a= $0,06 \pm 0,01$, - b= $0,10 \pm 0,01$, c= $0,14 \pm 0,01$, d= $0,17 \pm 0,01$.

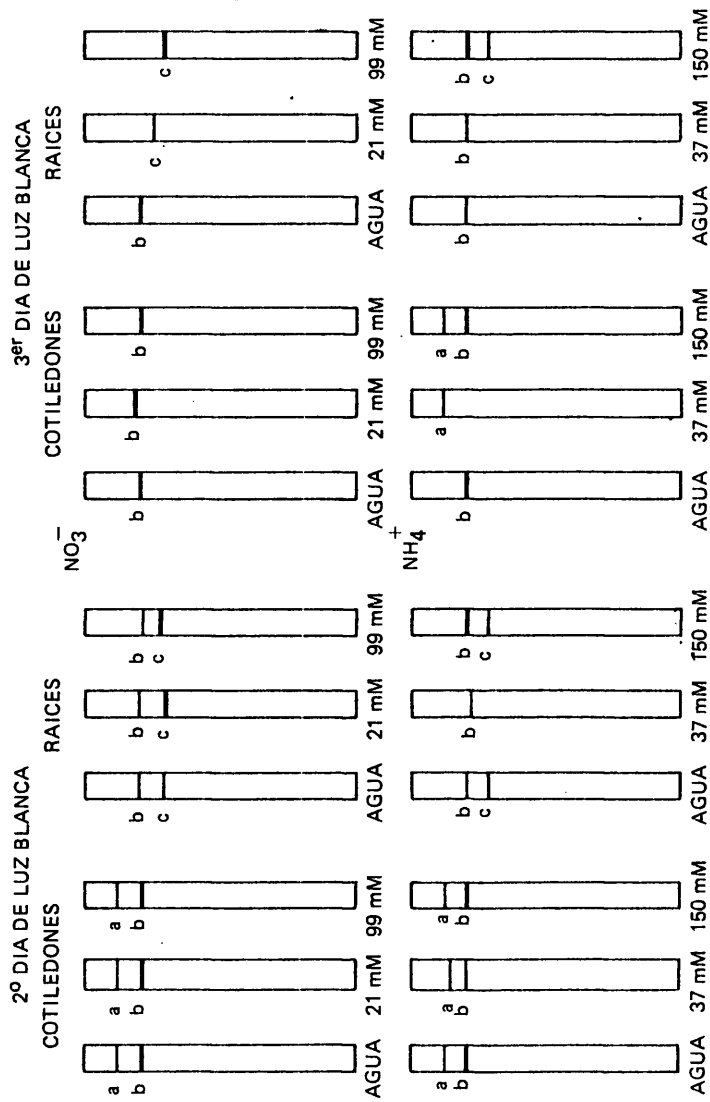


Figura 51.- Electroforesis en gel de poliacrilamida de la glutamato deshidrogenasa dependiente de NADH de cotiledones y raíces de plántulas sometidas a dos y tres días de luz blanca continua después de seis días de crecimiento en oscuridad sobre agua y distintas concentraciones de nitrato o amonio. Los valores de R_f son: a= $0,06 \pm 0,01$, b= $0,10 \pm 0,01$ y c= $0,14 \pm 0,01$.

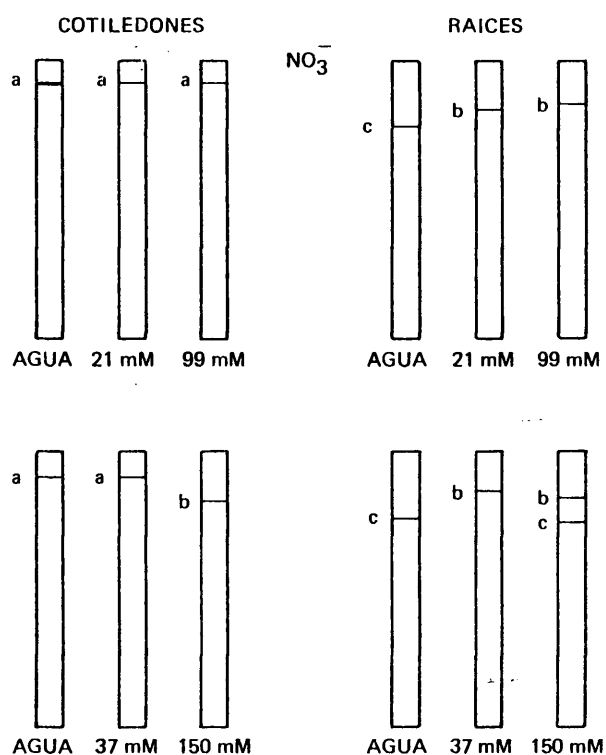


Figura 52.- Electroforesis en gel de poliacilamida de la -- glutamato deshidrogenasa dependiente de NADPH -- en cotiledones y raices de plántulas sometidas a tres días de iluminación con luz blanca continua después de seis días de germinación en oscuridad sobre agua y distintas concentraciones de nitrato o amonio. Los valores de Rf son: -- a= 0,06±0,01, b= 0,10±0,01 y c= 0,14±0,01.

tración, que además presenta la misma banda isoenzimática - que se observó para los nitratos (c).

Cuando el enzima utiliza NADPH como co-factor (Figura 52), el zimograma aparece consituído por la banda a en los cotiledones de plántulas crecidas sobre agua y nitratos. En amonio, aparece la misma banda isoenzimática para los crecidos sobre la menor concentración de amonio, - siendo sustituida por la banda isoenzimática b cuando crecieron sobre amonio 150mM. En raices, en agua aparece el -- isoenzima c, distinta a la encontrada en los cotiledones; - para los dos medios nitrogenados aparece el isoenzima b, - salvo para el amonio 150mM que presenta además un isoenzima idéntico al encontrado en agua (c).

3.6.- Influencia de inhibidores de síntesis de proteínas so
bre los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa y glu
tamina sintetasa.

Se han estudiado los porcentajes de inhi
bición enzimática en plántulas crecidas durante seis días - en oscuridad continua sobre medios de nitrato o amonio y -- mantenidas en suspensión sobre actinomicina D (20ug/ml), ci
cloheximida (150 ug/ml) o cloranfenicol (200 ug/ml) durante un periodo de 24 horas en oscuridad o de tratamiento con - luz blanca continua, en cuyo caso sólo se utilizaron los ór
ganos de la plántula, medios y concentraciones que produ-
cían incrementos en los niveles de actividad enzimática.

Tabla 1.- Influencia de inhibidores de síntesis de proteínas sobre los niveles de actividad glutamina sintetasa. Los cotiledones y raíces de plántulas crecidas sobre medios - con nitrato o amonio durante seis días en oscuridad, se mantuvieron en suspensión sobre actonomicina D (20ug/ml), cicloheximida (150ug/ml) o cloranfenicol (200ug/ml) durante un periodo de 24 horas en oscuridad (A) o de tratamiento con luz blanca - continua (B).

(A)	Agua	Actividad específica (% de inhibición)			
		NO ₃ ⁻		NH ₄ ⁺	
		21mM	99mM	37mM	150mM
-----	0,020	0,015	0,022	0,020	0,005
Actinomicina D	0,0067(66,5)	0,0048(68,0)	0,0033(85,0)	0,0026(87,0)	0,0029(42,0)
Cicloheximida	0,0062(68,8)	0,0026(80,4)	0,0045(79,5)	0,0048(75,5)	0,0044(10,8)
Cloranfenicol	0,0069(65,4)	0,0069(53,4)	0,0076(65,4)	0,0066(68,6)	0,0057(0,0)
-----	0,420	0,180	0,290	0,580	0,350
Actinomicina D	0,114(72,8)	0,070(61,1)	0,270(6,8)	0,142(75,3)	0,276(21,1)
Cicloheximida	0,108(74,2)	0,121(32,5)	0,184(36,4)	0,217(62,5)	0,298(14,5)
Cloranfenicol	0,052(87,3)	0,025(85,8)	0,070(75,5)	0,063(89,0)	0,078(77,5)
(B)					
-----	0,115	0,094	0,124	0,125	0,076
Actinomicina D	0,009(93,8)	0,003(96,3)	0,005(95,4)	0,004(96,3)	0,008(89,3)
Cicloheximida	0,010(93,0)	0,005(94,6)	0,007(94,2)	0,004(96,1)	0,009(87,1)
Cloranfenicol	0,093(39,7)	0,032(44,1)	0,074(39,8)	0,063(49,3)	0,053(29,1)
-----	-	-	-	1,432	-
Actinomicina D	-	-	-	1,111(22,4)	-
Cicloheximida	-	-	-	1,003(29,9)	-
Cloranfenicol	-	-	-	1,073(25,0)	-

En oscuridad, en los cotiledones de plántulas crecidas sobre agua se observa una disminución similar en los niveles de actividad glutamina sintetasa para todos los inhibidores de la síntesis protéica usados. Cuando las plántulas crecieron sobre nitrato, los porcentajes de inhibición fueron superiores con actinomicina D y cicloheximida, y mayores a su vez al aumentar la concentración de nitrato en el medio nutritivo. En presencia de amonio, los menores porcentajes de inhibición de la glutamina sintetasa se consiguen cuando la incubación se realizó con cloranfenicol, obteniéndose los mayores para la mayor concentración de amonio. En las raíces de plántulas crecidas así mismo en oscuridad y sobre agua, se observan niveles de inhibición en la síntesis de proteínas similares a los de los cotiledones, salvo que el cloranfenicol provoca los mayores porcentajes de inhibición. Cuando se utiliza nitrato como fuente de nitrógeno, los mayores niveles de inhibición se observan en presencia del cloranfenicol, al igual que en agua, obteniéndose los menores para la mayor concentración de nitrato. Así mismo, cuando las plántulas crecieron sobre amonio, el mayor porcentaje de inhibición se consigue cuando se utiliza cloranfenicol, disminuyendo a medida que se aumenta la concentración.

El tratamiento con luz blanca, en los cotiledones se traduce en un aumento en el grado de inhibición de la glutamina sintetasa cuando se utiliza actinomicina D o cicloheximida, inhibición comprendida entre el 87,1% y el 93,0% para todos los medios y concentraciones utilizadas; la presencia de cloranfenicol se traduce en una disminución en el porcentaje de inhibición con respecto a la oscuridad y significativamente inferior a los obtenidos para los otros inhibidores. En las raíces, se obtienen similares porcentajes de inhibición para los tres inhibidores de síntesis de proteínas utilizados (TABLA 1).

88

DISCUSSION

4.1.- Efecto de la fuente nitrogenada, nitrato o amonio, sobre los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa y glutamina sintetasa.

La presencia de nitratos en el medio nutritivo incrementa los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa, tanto en los cotiledones como en las raíces y para ambos piridín nucleótidos hasta el sexto día de germinación oscura, a partir del cual su presencia se traduce en un descenso en los niveles de actividad enzimática (con respecto a las plántulas crecidas sobre agua) (Figs. 1, 2, 3, 4). El efecto de los nitratos sobre los niveles de actividad glutamina sintetasa varía con el órgano de la plántula en estudio. En los cotiledones, el nitrato disminuye los niveles de actividad enzimática hasta el sexto día de germinación; en tanto que en las raíces esta disminución se observa a lo largo de todo el periodo de tratamiento oscuro -- (Figs. 9 y 10).

La utilización de amonio como fuente nitrogenada produce un efecto distinto en los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa dependiendo del órgano de la plántula considerado. En los cotiledones, a partir del cuarto día de germinación oscura, los niveles de actividad enzimática superan significativamente los obtenidos en ausencia de amonio (plántulas crecidas sobre agua) tanto para el enzima dependiente de NADH como para el ligado a NADPH; en tanto que en las raíces este efecto no es tan claro para el enzima glutamato deshidrogenasa que utiliza NADH como cofactor, mientras que en líneas generales, la inclusión de amonio en el medio nutritivo incrementa los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa dependiente de NADPH (Figs. 5, 6, 7 y 8), resultados similares a los obtenidos por -- KANAMORI y colaboradores (1972). A nivel de la glutamina sintetasa, la presencia de amonio en el medio de cultivo incrementa los niveles de actividad del enzima en los cotiledones durante los cinco primeros días de germinación en oscuridad, siendo a partir de entonces inferiores a los obtenidos en su ausencia, no ocurriendo esto último en las raíces donde el amonio incrementa siempre los niveles de actividad glutamina sintetasa (Figs. 11 y 12) resultados simila

res a los observados por WEISSMAN (1972) en raíces de girasol y por MARWAHA y colaboradores (1972) en semillas de -- arroz. Así pues, la influencia que la distinta fuente nitrogenada ejerce sobre los niveles de actividad de ambas enzimas es diferente según el tiempo en la germinación, habiendo encontrado una modificación de la respuesta, cuando la -- hay, entre el cuarto y el sexto día de esa; respuesta que -- varía así mismo según el órgano de la plántula.

También se observa respecto a la influencia de la fuente nitrogenada sobre los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa tanto dependiente de NADH como de NADPH, una relación con el órgano. En los cotiledones de -- plántulas crecidas sobre amonio se alcanzan niveles de actividad enzimática del orden de aproximadamente dos veces superiores a los encontrados para las plántulas crecidas sobre nitrato, lo cual justifica para este órgano el postulado de que el enzima glutamato deshidrogenasa es la ruta alternativa de asimilación del nitrógeno cuando este se encuentra como amonio (MIFLIN y LEA, 1977); sin que se modifique significativamente las proporciones de actividades NADH: NADPH que se mantiene en un orden de aproximadamente 6:1 -- (Figs. 1, 2, 5 y 6). En las raíces, los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa son los mismos independientemente de la fuente nitrogenada del medio de cultivo, sin -- que se modifique significativamente la relación de actividades NADH: NADPH (Figs. 3, 4, 7 y 8) al igual que ocurría en los cotiledones. En este sentido, el único trabajo encontrado es el de SHATILOV y colaboradores (1978) que detectan -- contrariamente a nuestros resultados, una glutamato deshidrogenasa ligada a NADP inducida o dependiente de amonio, -- mientras que de nuestros resultados parece deducirse que la proporción de actividades NADH: NADPH no va a depender de -- la fuente nitrogenada, no modificando esta el dominio de -- una sobre la otra.

Por el contrario, los niveles de actividad glutamina sintetasa encontrados en los cotiledones son muy similares tanto si las plántulas habían crecido sobre -- nitrato como sobre amonio; mientras que los niveles de actividad enzimática detectados en raíces de plántulas crecidas

sobre amonio son ligeramente superiores a las crecidas sobre nitratos; es decir, sólo se observa modificación de la fuente nitrogenada sobre los niveles de actividad glutamina sintetasa a nivel de las raíces (Figs. 9, 10, 11 y 12). Estos resultados no estarían de acuerdo con lo observado por --- EMOND y colaboradores (1979) en Anacystis nidulans, que detectaron mayores niveles de actividad glutamina sintetasa - en las crecidas sobre nitratos que sobre amonio.

En cuanto a la distribución de la glutamato deshidrogenasa en la plántula, tanto en las crecidas - sobre amonio como sobre nitrato en el medio nutritivo, los mayores niveles de actividad enzimática se han localizado a nivel de la raíz, resultados que corroboran los discutidos por la mayoría de los autores, entre otros SRIYASTAVA et al (1972) en trigo, WALLACE (1973) en maíz, JOY (1967) en Beta vulgaris, y SOULEN y colaboradores (1969) en soja. En presencia de nitrato como fuente nitrogenada, los niveles de - actividad glutamato deshidrogenasa encontrados en las raíces son del orden de aproximadamente quince veces superiores para el enzima ligado a NADH y de hasta once veces superiores para el ligado a NADPH con respecto a los cotiledones; mientras que el amonio reduce esa proporción hasta -- aproximadamente ocho y nueve respectivamente. Es decir, la presencia de amonio en el medio de incubación modifica los niveles de actividad enzimática de distinta forma en raíces y cotiledones, al igual que hemos visto para otros aspectos estudiados. De igual manera, los niveles de actividad glutamina sintetasa encontrados en las raíces son del orden de hasta treinta y ocho veces para las que crecieron sobre amonio, proporciones que no han podido ser constatadas dada -- la escasez de estudios realizados en este sentido en órganos disntintos de una misma planta. Es decir, el amonio que incrementaba los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa a nivel de los cotiledones, aumenta por el contrario y - de forma más acusada los niveles de actividad glutamina sintetasa en las raíces.

4.2.- Regulación de las actividades glutamato deshidrogenasa y glutamina sintetasa en función de la concentración de

la fuente nitrogenada..

La adición de fuente nitrogenada, nitrato o amonio, no modifica el comportamiento de los enzimas. glutamato deshidrogenasa y glutamina sintetasa, en su ausencia. La posibilidad de un sistema de regulación conjunta entre ambos enzimas capaz de obtener el máximo de rendimiento en la asimilación del nitrato o del amonio, se deducirá de la posible capacidad de compensación que exista entre sus vías de asimilación.

Cuando el medio nutritivo contiene nitrato, el aumento en la concentración de este se traduce, tanto en los cotiledones como en las raíces, en un descenso en los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa dependiente de NADH, resultados ya observados por DUKE y colaboradores (1976, 1978) en Glycine max. Por el contrario cuando el enzima utiliza NADPH como cofactor se obtienen resultados inversos a los anteriores, más acusadamente en raíces (Figs. 2 y 4) de forma similar a lo encontrado por KRETOVICH y colaboradores en Chlorella pyreïnodosa, y en otras algas por EPPLEY y colaboradores (1970). A nivel de la glutamina sintetasa, el aumento en la concentración de nitrato en el medio de crecimiento, que producía un aumento en los niveles de actividad del enzima en Lemna minor (RHODES et al, 1976), sólo es apreciable en nuestro caso en los cotiledones, sin que se observe una secuencia clara y gradual entre concentración de nitrato y niveles de actividad glutamina sintetasa en las raíces (Figs. 9 y 10).

En líneas generales, se observa a partir de los resultados anteriores una correspondencia inversa entre los niveles de actividad glutamina sintetasa y glutamato deshidrogenasa en el tiempo, de forma que el periodo de menor actividad de una de ellas se corresponde con el de máxima actividad de la otra.

La posibilidad de asimilación del nitrato presente en el medio nutritivo a altas concentraciones - vendría asegurada a nivel de los cotiledones por los incrementos en los niveles de actividad que esas producen tanto a nivel de la glutamato deshidrogenasa dependiente de NADPH como de la glutamina sintetasa, que compensaría de alguna -

forma los descensos observados en los niveles del enzima -- glutamato deshidrogenasa ligada a NADH a partir del quinto día de germinación oscura. En las raíces, aunque no se observa una respuesta clara, sí que se ha encontrado una cierta complementaridad entre la glutamato deshidrogenasa dependiente de NADH y la que utiliza NADPH como cofactor, de manera que la presencia de altas concentraciones de nitrato en el medio disminuyen los niveles de actividad enzimática dependiente de NADH a lo largo del tratamiento oscuro y paralelamente hay un incremento progresivo en los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa dependiente de NADPH. Por otra parte, las bajas concentraciones de nitrato en el medio de crecimiento se asimilarían de forma mayoritaria a nivel de la glutamato deshidrogenasa que utiliza NADH como cofactor, tanto en los cotiledones como en las raíces. Es decir, a nivel de la plántula completa se ha desarrollado un sistema -- que asegura la máxima incorporación de los nitratos del medio, dado que por una parte la etapa de asimilación de estos llevada a cabo por la nitrato reductasa puede frenarse por la presencia de amonio (GOLDSMITH et al, 1973; PISTORIUS et al, 1976), y así mismo evita la posible intoxicación por este, por su incorporación mayoritaria en aminoácidos.

Cuando el medio de crecimiento contiene amonio, el aumento en la concentración de este incrementa -- los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa tanto -- NADH como NADPH dependientes, resultados que corroboran los ya existentes en la mayoría de la documentación (KRETOVICH et al, 1971, 1972, 1973; KANAMORI et al, 1972; CHOU et al, 1973; CALDAS et al, 1976; SIHAG et al, 1979; MOHANTY et al, 1980) (Figs. 5, 6, 7 y 8). Inversamente, el aumento en la -- concentración de amonio en el medio de incubación se traduce en una disminución en los niveles de actividad glutamina sintetasa, tanto en los cotiledones como en las raíces -- (Figs. 11 y 12), resultados conformes con los encontrados -- en la literatura (SHAPIRO et al, 1970; GIVAN, 1975; RHODES et al, 1975; BISHOP et al, 1976; STEWART et al, 1977). La -- influencia de la concentración de amonio sobre los enzimas glutamato deshidrogenasa y glutamina sintetasa podría deber

se a la acción directa de este, dada su posible translocación desde la raíz a los cotiledones (CHANTAROTWONG et al, 1976) o bien productos derivados de su reducción, glutamato o glutamina (HILL-COTTINGHAM, 1979). Es decir, la presencia de altas concentraciones de amonio en el medio nutritivo se traduce, tanto en los cotiledones como en las raíces, en una total correspondencia paralela e inversa entre los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa y glutamina sintetasa, de tal forma que los altos niveles de actividad glutamina sintetasa descienden hasta llegar a un mínimo al cuarto día de germinación oscura, a partir del cual se incrementan los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa, existiendo una complementaridad entre ambas en el tiempo. Esto corroboraría el postulado de RHODES y colaboradores en Lemna minor, según el cual el potencial de asimilar concentraciones tóxicas de amonio se reduce por represión de la glutamina sintetasa y se compensa por un incremento a nivel de la glutamato deshidrogenasa. La operación combinada de estos dos enzimas permite así proveer del glutamato necesario para la biosíntesis y evitar la excesiva acumulación de amonio libre en la célula.

Para determinar si el efecto de las concentraciones de la fuente nitrogenada, nitrato o amonio, sobre los niveles de actividad enzimática se realizaba a nivel de síntesis, se utilizaron inhibidores de la síntesis de proteínas. La interpretación de los datos obtenidos requiere un análisis mucho más exhaustivo de los resultados de los que pudieran observarse considerando únicamente el nivel de actuación de estos inhibidores. Los resultados obtenidos del efecto de los inhibidores sobre los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa solamente pueden ser considerados como ligeramente indicativos dada la falta de concordancia entre el grado de inhibición y los niveles de actividad enzimática. La excreción del enzima al medio de incubación es despreciable y no justifica la pérdida de actividad enzimática observada frente a la que cabría esperar. El haber encontrado una significativa inactivación del enzima por la actinomicina D, obliga a ampliar este análisis con un estudio paralelo del efecto de posibles activaciones

e inactivaciones del enzima por la presencia de inhibidores, del medio nitrogenado o bien de otros que puedan ser producidos por este.

El hecho de que el efecto de los inhibidores de síntesis de proteínas es totalmente paralelo a los niveles de actividad glutamina sintetasa obtenidos, nos ha permitido que el análisis de los datos sea posible. En los cotiledones de plántulas crecidas en ausencia de fuente nitrogenada, el incremento observado durante un día de germinación oscura disminuye por igual por la presencia indistinta de los tres inhibidores, lo cual parece indicar que este aumento en el nivel de actividad enzimática es debido a la síntesis del enzima cuantitativamente tanto a nivel citoplásmico como organular. El efecto de la mayor concentración de nitrato, que incrementaba los niveles de actividad glutamina sintetasa paralelamente, parece aumentar la síntesis fundamentalmente a nivel citoplásmico, dado que los mayores niveles de inhibición se obtienen para la actinomicina D; alcanzándose después del tratamiento similares niveles de actividad glutamina sintetasa a los obtenidos en el agua. La utilización de amonio como fuente de nitrógeno, que suponía un descenso en los niveles de actividad glutamina sintetasa, - al aumentar su concentración produce los mayores grados de inhibición para la menor concentración, obteniéndose en ambos casos inferiores para el cloranfenicol; todo ello parece indicar que el efecto del incremento en la concentración de amonio se traduciría en una disminución de la síntesis - del enzima, esencialmente a nivel organular. En las raíces, el incremento observado en ausencia de fuente nitrogenada - es disminuido en mayor medida cuando se utiliza cloranfenicol, lo cual indicaría que al contrario que en los cotiledones, la síntesis mayoritaria se llevaría a cabo a nivel organular. El aumento en la concentración de nitrógeno, bien suministrado como nitrato bien como amonio, provoca los mayores grados de inhibición cuando se utiliza cloranfenicol, lo cual supondría una disminución de la síntesis del enzima provocado por el medio nutritivo a nivel citoplásmico, paralelamente el aumento en la concentración de nitrógeno.

El distinto comportamiento observado con

respecto a la fuente nitrogenada podría implicar la existencia de distintos enzimas con distinta dotación isoenzimática, tal como observó BARASH y colaboradores en hojas de avena, que detectaron la aparición de nuevos isoenzimas como consecuencia del tratamiento con amonio. En nuestro caso, el estudio electroforético de la glutamato deshidrogenasa, tanto dependiente de NADH como de NADPH, de cotiledones ha mostrado que es diferente al detectado en raíces, de manera similar a lo encontrado por THURMAN y colaboradores (1965) en distintos órganos de distintas especies. La inclusión de la fuente nitrogenada en el medio nutritivo produce distinto efecto según se trate de amonio o de nitrato. Aún así, no existe correlación entre los incrementos en los niveles de actividad enzimática y el número de isoenzimas, al contrario de lo propuesto por NAUEN y colaboradores (1980), existiendo exclusivamente a nivel de raíces de plántulas crecidas sobre amonio un incremento en el número de bandas isoenzimáticas.

4.3.- Efecto de la interacción luz-fuente nitrogenada sobre los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa y glutamina sintetasa.

Dado que en el primer periodo de iluminación se llevan a cabo una serie de transformaciones importantes para la plántula (desarrollo del aparato fotosintético, entre otros procesos), los resultados obtenidos en este pueden no ser suficientemente claros o significativos de la respuesta a la luz, se administró un segundo tratamiento intercalando un periodo de oscuridad para confrontar ambos resultados y poder establecer un comportamiento claro respecto a la luz.

El efecto individual de la luz sobre los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa es diferente dependiendo del órgano de la plántula en consideración: cotiledón o raíz. En los primeros, la luz provoca incrementos en los niveles de actividad enzimática, tanto dependiente de NADH como NADPH (Fig. 13 y 14) de forma similar a lo observado por BROWN y colaboradores en 1972 en hojas de avena, comparando con las encontradas en el periodo análogo en os-

curidad (Figs. 1 y 2) y en el segundo periodo de estas características intercalado en el tratamiento (Figs. 17 y 18) al igual que en el segundo periodo luminoso (Figs. 21 y 22). En las raíces, por el contrario, se observa un descenso en los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa, al contrario de lo observado por SAIRAM y colaboradores (1975) que encontraron que la luz blanca continua incrementaba la actividad glutamato deshidrogenasa en las raíces (Figs. 3, 4, 15, 16, 19, 20, 23 y 24).

Aunque se ha postulado una mayor síntesis de glutamina en reacciones dependientes de luz (MITCHELL y STOCKING, 1975; GIVAN, 1975), la bibliografía en este sentido es muy escasa. A nivel de la glutamina sintetasa, la luz provoca en los cotiledones de plántulas crecidas en ausencia de nitrato o amonio un aumento en los niveles de actividad enzimática con respecto a los detectados en oscuridad, siendo mucho más acusados durante el primer tratamiento luminoso (Figs. 9, 37, 39 y 41). Por el contrario, en las raíces la luz provoca descensos en los niveles de actividad glutamina sintetasa (Figs. 10, 38, 40 y 42).

La interacción de la luz con los nitratos presentes en el medio de cultivo provoca en los cotiledones incrementos en los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa dependiente de NADH cuando se utiliza la menor concentración de nitrato, aunque disminuya el efecto obtenido por la sola presencia de la luz en ambos periodos de iluminación (Figs. 1, 13, 17 y 21). Cuando el enzima utiliza --NADPH como cofactor, la aplicación de los tratamientos de luz sobre plántulas crecidas sobre nitratos provocan un incremento a lo largo de tiempo de experimentación, superando los niveles de actividad enzimática detectados en ausencia de nitratos (Figs. 2, 14, 18 y 24). Sin embargo, el efecto de la luz así como el de su interacción con la fuente nitrogenada parecen disminuir, en líneas generales, los niveles de actividad enzimática frente a los incrementos obtenidos en oscuridad, aunque estos resultados no puedan considerarse suficientemente significativos. En las raíces de plántulas crecidas sobre nitrato, solamente las mayores concentraciones (que en oscuridad producían los menores niveles de actividad glutamato deshidrogenasa dependiente de NADH), la

luz aumenta los niveles de actividad del enzima al contrario de lo observado para el de plántulas crecidas en ausencia - de la fuente nitrogenada (Figs. 3, 15, 19 y 23). Cuando el enzima utiliza NADPH como cofactor, la interacción de la -- luz con cualquiera de la fuente nitrogenada incrementa, con respecto a la exclusiva acción del nitrato, los niveles de actividad enzimática, siendo muy superiores a los obtenidos por efecto exclusivo de la luz, manteniéndose los mayores - niveles de actividad glutamato deshidrogenasa dependiente - de NADPH en raíces de plántulas crecidas sobre la mayor con centración de nitrato (Figs. 4, 16, 20 y 24). Es decir, la luz que produce incrementos en los niveles de actividad glu tamato deshidrogenasa en los cotiledones y los disminuye en las raíces, al interaccionar con los nitratos presentes en el medio nutritivo disminuye en los cotiledones, mientras - que en las raíces provoca un efecto contrario al debido ex clusivamente a la luz, tanto la glutamato deshidrogenasa - que utiliza NADH como cofactor como para el enzima ligado - a NADPH.

A nivel de la glutamina sintetasa, la in teracción de la luz con los nitratos no modifica el tipo de respuesta producido por la luz ni en los cotiledones ni en las raíces, superándose en aquellos los niveles de activi dad glutamina sintetasa alcanzados por esta a lo largo del tiempo de tratamiento; mientras que en las raíces sólo se - superan durante el período oscuro, manteniéndose los mayo res niveles de actividad glutamina sintetasa en las plántu las crecidas sobre la mayor concentración de nitrato (de - forma similar a lo detectado en oscuridad) (Figs. 9, 37, 39 41; 10, 38, 40 y 42). Es decir, la presencia de los nitra tos en el medio nutritivo, acentúa el efecto producido por la luz, obteniéndose los mayores niveles de actividad enzi mática en los cotiledones durante el período luminoso, y - para las raíces en el oscuro, y siempre para las mayores - concentraciones de nitrato.

En vista de todo lo expuesto hasta el - momento se podría pensar en la existencia de un sistema de regulación de la asimilación del nitrato en la plántula. - Así, en los cotiledones, a nivel de la glutamato deshidro-

genasa existiría un sistema de regulación conjunta o autorregulación que permitiría asimilar el nitrato en condiciones de baja disponibilidad en el medio, de tal manera que el descenso en los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa dependiente de NADH vendría de alguna forma compensado por la estimulación de la actividad enzimática ligada a NADPH. En las raíces, se desarrolla un sistema para las altas concentraciones de nitrato en el medio que asegura un mecanismo de asimilación de este, dado que en todos los tratamientos existe un incremento en los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa con respecto a los observados en ausencia de nitratos (Figs. 15, 19, 23, 16, 20 y 24). Esto sería lógico pues supone un beneficio máximo para la plántula dada la complementaridad que existe entre los cotiledones y las raíces, de modo que la presencia de altas concentraciones de nitrato en el medio nutritivo disminuiría los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa en los cotiledones y los aumentaría en las raíces; mientras que las bajas concentraciones de nitrato en el medio de incubación son asimiladas por la glutamato deshidrogenasa en los cotiledones durante el periodo oscuro, mientras que en las raíces la mayoría de la síntesis se realiza durante el periodo luminoso. Por otra parte, la glutamina sintetasa realiza una asimilación máxima del nitrato del medio nutritivo de una forma continua, de manera que en oscuridad el aumento en los niveles de actividad se realiza fundamentalmente en la raíz, y en los cotiledones durante el periodo luminoso, asegurando así a la plántula una incorporación continua del nitrato del medio externo. Es decir, Citrullus vulgaris ha desarrollado un mecanismo que le permite la máxima asimilación del nitrato del medio exterior por ambas rutas enzimáticas, glutamato deshidrogenasa y glutamina sintetasa.

Cuando el medio de crecimiento contiene amonio, la interacción de este con la luz se manifiesta en los cotiledones en un drástico descenso en los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa dependiente de NADH frente a los obtenidos por la presencia individual de ambos factores ambientales durante el primer periodo de iluminación observándose sólo para las mayores concentraciones de amo-

nio al igual que en oscuridad (Figs. 5, 25, 29 y 33). Cuando el enzima utiliza NADPH como cofactor, el efecto de la luz sobre los cotiledones de plántulas crecidas sobre amonio es disminuir los niveles de actividad enzimática observándose a lo largo de todo el tiempo de tratamiento una respuesta paralela a la producida exclusivamente por la luz, para la concentración que provoca los mayores niveles de actividad enzimática, que sigue siendo la misma que en oscuridad, 150mM (Figs. 6, 26, 30 y 34). Es decir, el incremento en los niveles de actividad enzimática producido por la luz se anula por la presencia del amonio en el medio de crecimiento. En las raíces de plántulas crecidas sobre amonio, la luz provoca una respuesta inversa a la obtenida en su ausencia, originando los máximos niveles de actividad glutamato deshidrogenasa ligada a NADH cuando crecieron sobre la menor concentración de amonio; sin observarse ningún efecto significativo para la mayor concentración de ese medio -- (Figs. 7, 27, 31 y 35). Cuando el enzima utiliza NADPH como cofactor, la interacción luz-amonio provoca mayores niveles de actividad enzimática que en ausencia de amonio en el medio nutritivo, pero menores que en ausencia de luz. Es decir, los grandes incrementos en los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa dependiente de NADPH obtenidos en oscuridad disminuyen por la luz aunque siempre superan los valores obtenidos en ausencia del amonio, respuesta mucho más acusada para la mayor concentración de este (Figs. 8, 28, 32 y 36).

A nivel de la glutamina sintetasa, en los cotiledones la interacción luz-amonio se traduce en una respuesta totalmente similar a la obtenida para el nitrato, salvo que el mayor incremento en los niveles de actividad glutamina sintetasa se realiza para la menor concentración de amonio en el medio nutritivo (Figs. 11, 43, 45 y 47). El efecto de la luz sobre las raíces de plántulas crecidas sobre amonio es incrementar los niveles de actividad enzimática frente al descenso obtenido en ausencia de amonio, así como en ausencia de luz, durante el primer periodo luminoso, atenuándose este efecto a lo largo del tratamiento (Figs. 12, 44, 46, 48). Es decir, la disminución de los niveles de ac-

tividad glutamina sintetasa en los cotiledones provocada por la presencia de amonio en el medio de cultivo en altas concentraciones va anulándose a lo largo del periodo de enverdecimiento desarrollándose la capacidad de asimilar las mayores concentraciones; en cambio en las raíces, la presencia de amonio en el medio de incubación aumenta su capacidad de asimilación durante el primer periodo de iluminación perdiéndose al avanzar los días en la germinación. De manera que las altas concentraciones de amonio en el medio de crecimiento aumenta los niveles de actividad glutamina sintetasa, tanto en luz como en oscuridad, así como los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa dependiente de NADH en los cotiledones y del enzima ligado a NADPH en las raíces durante el periodo oscuro; mientras que las bajas concentraciones de amonio provocan los mayores niveles de actividad glutamato deshidrogenasa ligada a NADH y de glutamina sintetasa.

El distinto efecto observado de la luz sobre ambas fuentes nitrogenadas según el enzima estudiado, glutamato deshidrogenasa y glutamina sintetasa, obliga a pensar en la posibilidad de inducción de nuevos isoenzimas como consecuencia de la fuente nitrogenada utilizada. El efecto individual de la luz provoca la desaparición paulatina de isoenzimas de la glutamato deshidrogenasa ligada a NADH, efecto que no se modifica cuando están presentes en el medio de crecimiento el nitrato o el amonio, manteniéndose el mayor número de bandas isoenzimáticas en las raíces cuando se aumenta la concentración de amonio en el medio, al igual que ocurría en oscuridad. El modelo isoenzimático de la glutamato deshidrogenasa dependiente de NADPH presenta una única isoenzima que es la misma tanto en el tratamiento oscuro como en presencia de luz, salvo para el enzima de raíces de plántulas crecidas sobre amonio cuyo comportamiento es similar al obtenido para el enzima dependiente de NADH (Figs 49, 50, 51 y 52). Este efecto no pudo ser analizado para el enzima glutamina sintetasa por no detectarse isoenzimas con el único método encontrado en la bibliografía. De todo lo expuesto se deduce que este diferente comportamiento no es debido a diferencias en la dotación isoenzimática.

La posibilidad de que las distintas respuestas encontradas según la concentración de la fuente nitrogenada pudieran efectuarse a nivel de síntesis del enzima, se analizó de igual forma que en el tratamiento oscuro. El incremento de actividad glutamina sintetasa observado durante el primer día de iluminación respecto al mismo periodo de tratamiento oscuro parece deberse a la síntesis del enzima a nivel citoplásmico, dado que las diferencias del grado de inhibición obtenida entre los inhibidores de síntesis de proteínas a nivel citoplásmico y el cloranfenicol, se incrementa drásticamente después del tratamiento luminoso.

02 71)

CONCLUSIONES

- 1.- La asimilación mayoritaria del nitrógeno se lleva a cabo en la raíz, tanto durante el periodo de germinación en oscuridad como durante el enverdecimiento.
- 2.- La influencia de la fuente nitrogenada sobre los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa y glutamina sintetasa varía con el órgano de la plántula. La inhibición de la síntesis de la glutamina sintetasa por el incremento en la concentración de amonio se realiza en los cotiledones a nivel organular, y en las raíces a nivel citoplásmico; mientras que el aumento en la síntesis de glutamina sintetasa producido por el incremento en la concentración de nitrato se lleva a cabo en los cotiledones a nivel citoplásmico, y en las raíces a nivel organular.

El modelo isoenzimático de la glutamato deshidrogenasa para cada fuente nitrogenada depende del órgano de la plántula. El incremento en la concentración de amonio provoca síntesis de novo de isoenzimas en las raíces, paralelamente a los incrementos en los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa.

- 3.- La glutamina sintetasa representaría en la semilla la forma mayoritaria de reserva enzimática de asimilación de nitrógeno; a lo largo de la germinación en oscuridad durante la etapa de desarrollo de los órganos de la plántula descienden drásticamente los niveles de actividad glutamina sintetasa de forma paralela a los incrementos de los de la glutamato deshidrogenasa.
- 4.- El efecto de la luz provoca la desaparición paulatina de isoenzimas de la glutamato deshidrogenasa (salvo para el enzima que utiliza NADPH como cofactor que mantiene la misma única banda) efecto que no se modifica cuando el nitrato o el amonio están presentes en el medio, manteniéndose el mayor número de isoenzimas cuando aumenta la concentración de amonio, como ocurría en oscuridad.

Los incrementos en los niveles de actividad glutamina sintetasa inducidos por la luz son debidos a aumento de la síntesis a nivel citoplásmico.

- 5.- El amonio resulta la fuente nitrogenada que produce los mayores niveles de actividad tanto glutamina sintetasa como glutamato deshidrogenasa, dado que se consiguen duplicar en cotiledones los de la glutamato deshidrogenasa, y en raices los de la glutamina sintetasa frente a los obtenidos cuando las plántulas crecieron sobre nitratos.

La proporción de actividades glutamato - deshidrogenasa NADH:NADPH no se modifica por la fuente nitrogenada.

- 6.- Se propone que Citrullus vulgaris L. variedad comercial reina ha desarrollado un sistema de compensación enzimática para asegurar la máxima asimilación del nitrógeno del medio cuando este se encuentra tanto en forma de nitrato como de amonio, por una parte a nivel de la propia glutamato deshidrogenasa así como de esta con la glutamina sintetasa.

Durante el periodo de germinación en oscuridad se tiende a asegurar la máxima asimilación del nitrato presente en altas concentraciones en el medio mediante una compensación de los descensos obtenidos para la glutamato deshidrogenasa dependiente de NADH, como consecuencia del incremento en la concentración de nitrato en el medio, con incrementos paralelos en el enzima dependiente de NADPH, a los que se sumarían los de la glutamina sintetasa, tanto en cotiledones como en raices. El proceso de enverdecimiento conlleva una modificación del sistema de compensación. Las altas concentraciones de nitrato provocan descensos en los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa dependiente de NADH en los cotiledones que tienden a compensarse con los incrementos en los niveles de actividad del enzima ligado a NADPH de cotiledones y fundamentalmente con la totalidad del enzima en raices. Por otra parte, las

mayores concentraciones de nitrato producen los mayores niveles de actividad glutamina sintetasa, lo cual asegura así mismo a nivel de este enzima aislado la máxima asimilación de nitratos, llegando incluso a compensar los descensos obtenidos durante el periodo de oscuridad en los cotiledones con los incrementos obtenidos en la raíz, de manera que la asimilación se realizaría de una forma continua.

La asimilación máxima del amonio, cuyo incremento en la concentración produce descensos en los niveles de actividad glutamina sintetasa, tendería a asegurarse por los aumentos paralelos obtenidos a nivel de la glutamato deshidrogenasa, tanto en raíces como en cotiledones durante el periodo de germinación en oscuridad. Durante el periodo de enverdecimiento, los descensos en los niveles de actividad glutamato deshidrogenasa ligada a NADH en raíces producidos por los incrementos en la concentración de amonio se compensan con los incrementos en la glutamato deshidrogenasa paralelos obtenidos en los cotiledones que compensaría así mismo los pequeños descensos producidos a nivel de la glutamina sintetasa. La asimilación continua del amonio vendría asegurada dado que los mínimos de actividad obtenidos durante el periodo de luz por la glutamato deshidrogenasa y el de oscuridad por la glutamina sintetasa se corresponden con los máximos de la glutamina sintetasa y de la glutamato deshidrogenasa respectivamente.

La teoría propuesta por LEA y MIFLIN no se ajusta a este esquema más que en algunos comportamientos particulares; la vía glutamato deshidrogenasa es una vía funcional para el nitrato como la glutamina sintetasa lo es para el amonio.

✓ 12

BIBLIOGRAFIA

- ARIMA, Y. and KUMAZAWA, K. (1977): Plant Physiol. 18:1121-1129.
- ASLAM, M., HUFFAKER, R.C. and TRAVIS, R.L. (1973): Plant Physiol 52:137-141.
- ASLAM, M., HUFFAKER, R.C., RAINS, D.W. and RAO, K.P. (1979): Plant Physiol. 63: 1205-1209.
- AYOONAIKE, K.O., LEA, P.J. and MIFLIN, B.J. (1979): In "Nitrogen assimilation in plants". HEWITT, E.J. and CUTTING, C.V. eds. Academic Press. New York. 91-95
- BARASH, I., MOR, H. and SADON, T. (1973): Nat. New Biol. 244:150-152.
- BARASH, I., MOR, H. and SADON, T. (1975): Plant Physiol 56:856-858.
- BARRIE, A. (1974): Biochem. J. 143:317-329.
- BAUER, A., URQUHART, A.A. and JOY, K.W. (1977): Ibid. 59:915-919.
- BAYLEY, J.M., KING, J. and GAMBORG, O.L. (1972): Planta (Berl) 105:15-24.
- BEEVERS, L. (1976): In "Nitrogen metabolism in plants" Arnold
- BEEVERS, L. and HAGERMAN, R.H. (1969): Ann. Rev. Plant Physiol. 20: 495-522.
- BEEVERS, L., SCHRADER, L.E., FLESHER, D. and HAGERMAN, R.H. (1965): Plant Physiol. 40:691-698.
- BIDWELL, R.G.S. and DURZAN, D.S. (1975): In "Historical and current aspects of plant physiology". DAVIES P.J. ed. New York. Cornell Univ. Press. 152-162.

- BIELAWSKI, W. and RAFALSKI, A. (1979): Acta Biochim. Pol. 26:
383-396.
- BISHOP, P.E., GUEVARA, J.G., ENGELKE, J.A. and EVANS, H.J. (1976):
Plant Physiol. 57:542-545.
- BOLAND, M.J. and BENNY, A.G. (1977): Eur. J. Biochem. 79:355-362.
- BONE, D.H. (1959): Nature. 184:990-993.
- BOWERMAN, A. and GODMAN, P.J. (1971): Ann. Bot. 36:353-366.
- BRETERLER, H. and NISSEN, P. (1979): Ibid. 47:49-56.
- BROWN, A., COLEN, A.H. and FISHER, H.F. (1979): Biochem. 18:5924-
5928.
- BROWN, C.M., BURN, V.J. and JOHNSON, B. (1973): Nature. N.B. 246:115
- BROWN, D.H. and HASLETT, B. (1972): Planta (Berl). 103:129-133.
- BROWN, C.M., MACDONALD-BROWN, D. and MEERS, J.L. (1974): Adv. Microb.
Physiol. 11:1-45.
- BROWN, C.M. and DILWORTH, M.J. (1975): J. Gen. Microbiol. 86:39-48.
- BRYAN, J.K. (1976): In "Plant Biochemistry". BONNER, J. and VAR-
NER, J.E. eds. New York. Academic 525-568.
- BUCHANAN, J.M. (1973): In "Enzymes of glutamine metabolism".
PRUSINER, S. and STADTMAN, E.R. eds. Acade-
mic Press. New York 387.
- BULEN, W.A. (1965): Arch. Biochem. 62:173-183.
- CALDAS, R.A. and CALDAS, L.S. (1976): Plant Physiol. 37:111-116.
- CALDOS, R. (1971): Ph.D. Thesis. Columbus Univ. Ohio State.

- CANVIN, D.T. and ATKINS, C.A. (1974): *Planta* 116:207-224.
- CHANTAROTWONG, W., HUFFAKER, R.C. and MILLER, S.L. (1976): *Plant Physiol.* 57:519-522.
- CHIU, J.Y. and SHARGOOL, P.D. (1979): *Plant Physiol.* 63:409-415.
- CHOU, K.W. and SPLITSTOESSE, W.E. (1972): *Plant Physiol.* 49:550-554.
- DAVIES, S.J. (1960): *Ann. New York Academic Science*: 121:404-427.
- DAVIES, D.D. and TEIXEIRA, A.N. (1975): *Phytochem.* 14:647-656.
- DEITZER, G.F., KEMPF, O., FISHER, S. and WAGNER, E. (1974): *Planta* 117:29-41.
- DEUEL, T.F. and STADTMAN, E.R. (1970): *J. Biol. Chem.* 245:5206-5213.
- DHARMAWARDENE, M.W.N., HAYSTEAD, A. and STEWART, W.D.P. (1973): *Arch. Microbiol.* 90:281-296.
- DI PRISCO, G. (1975): *Arch. Biochem. Biophys.* 171:604-612.
- DOUGALL, D.K. (1974): *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 58:639-646.
- DUBOIS, E., GRENSON, M. and WIANE, J.M. (1974): *J. Chem.* 48:603-616.
- DUKE, S.H., FRIEDRICH, J.W., SCHRADER, L.E. and KOUKKARI, W.L. (1978): *Plant Physiol.* 42:269-276.
- DUKE, S.H. and HAM, G.E. (1976): *Plant Cell Physiol.* 17:1037-1044.
- DUKE, S.H. and KOUKKARI, W.L. (1977): *Plant Physiol.* 39:67-72.
- DUKE, S.H., SCHRADER, L.E., HENSON, C.A., SERVAITES, J.C., VOGELZANG, R.D., and PENDLETON, J.W. (1979): *Plant Physiol.* 63:956-962.

- DUNN, S.D. and KLUCAS, R.V. (1973): Can. J. Microbiol. 19:1493-1499.
- EHMKE, A. and HARTMANN, T. (1976): Phytochem. 15:1611-1617.
- EHMKE, A. and HARTMANN, T. (1978): Phytochem. 17:637-641.
- ELLIOT, W.H. (1955): In "Methods in Enzymology". COLOWICK, S.P. and KAPLAN, N.O. eds. Academic Press. New York. vol 2 337-342.
- EPSTEIN, E. (1973): "Mineral nutrition of plants: principles -- and perspectives". WILEY ed. New York.
- FERGUSON, A.R. and SIMS, A.P. (1974): J. Gen. Microbiol. 80:173-185.
- FOLKES, B. and SIMS, A.P. (1974): J. Gen. Microbiol. 82:77-95.
- FOWDEN, L. (1979): In "Nitrogen assimilation of plants". HEWITT, E.J. and CUTTING, C.V. eds. Academic Press. New York. 1-14.
- FOWLER, M.W. and BARKER, R.D.J. (1979): In "Nitrogen assimilation of plants". HEWITT, E.J. and CUTTING, C.V. eds. Academic Press. New York. 489-500.
- FOWLER, M.W., JESSUP, W. and SARLISSIAN, G.S. (1974): Febs. Lett. 46:340-343.
- GARLAND, W.J. and DENNIS, D.T. (1977): Arch. Biochem. Biophys. 182: 614-625.
- GASPARIKOVA, O., PSENAKOVA, T. and NIZNANSKA, A. (1978): Biol. -- (Bratislava) 33:35-42.
- GINSBURG, A. and STADTMAN, E.R. (1973): In "The enzymes of glutamine metabolism". PRUSINER, S. and STADTMAN, E.R. eds. Academic Press. New York. 9-13.

- GIVAN, A.L. and LEECH, R.M. (1970): Plant Physiol. 45: 624-630.
- GIVAN, A.L. and LEECH, R.M. (1971): Biol. Rev. 46: 409-428.
- GIVAN, C.V. (1975): Planta. 122: 281-291.
- GIVAN, C.V. (1976): Plant Physiol. 57: 623-627.
- GIVAN, C.V. (1979): Phytochem. 18: 375-382.
- GOLDSMITH, J., LIRONI, J.P., NORBERG, C.L. and SEGEL, J.H. (1973):
Plant Physiol. 52: 362-668.
- GROAT, R.G. and SÖULEN, J.K. (1977): Plant Physiol. Suppl. 59:
70-73.
- HAGEMAN, R.H. and FLESHER, D. (1960): Ibid. 35: 700-708.
- HALBROCK, K. and RAGG, H. (1975): Arch. Biochem. Biophys. 166:
41-46.
- HELLER, R. (1969): Biologie végétale. MASSON et Cie eds. 2: 400
- HEWITT, E.J. (1975): Ann. Rev. Plant Physiol. 26: 25-32.
- HEWITT, E.J., HUCKLESBY, D.P. and NOTTON, B.A. (1976): In "Plant
Biochemistry". BONNER, J. and VARNER, J.
eds. Academic Press. New York. 633-681.
- HILL-COTTINGHAM, D.G. and LLOYD-JONES, C.P. (1979): In "Nitrogen
assimilation in plants". HEWITT, E.J. and
CUTTING, C.V. eds. Academic Press. New York.
397-406.
- ISHIHARA, M., KONNO, S. and TAKATSUJI, T. (1977): Bull. Fruit tree.
Rev. Res. Stn. (Japan) Ser. A. (Hiratsuka).
4: 67-69.
- IVANKO, S. and INGUERSEN, J. (1971): Plant Physiol. 24: 355-362.

- IVANKO,S. and MAXINOVA,A.(1974):In "Structure and function -
of primary root tissues".KOLEL,J.ed. --
Veda Slovak Academy of Sciences.(Bratis-
lava).461-469.
- JOHNSON,B.(1974):J.Gen.Microbiol.85:169-
- JONES,R.W. and SHEARD,R.W.(1978):Plant Science Lett.11:
285-291.
- JORDAN,B.R. and GIVAN,C.V.(1979):Plant Physiol.64:1043-1047.
- JOY,K.W.(1971):Plant Physiol.47:445-446.
- JOY,K.W.(1973):Phytochem.12:1031-1040.
- KANAMORI,T.,KONISHI,S.,and TAKAHASHI,E.(1972):Plant Physiol.
26:1-6.
- KANAMORI,T. and MATSUMOTO,H.(1972):Arch. Biochem.Biophys.
159:113-122.
- KATO,T.(1980):Plant Physiol.48:416-420.
- KEYS,J.(1973):In "The biological efficiency of protein pro-
duction"JONES,J.G.W.ed.Cambridge Univ.
69-82.
- KINGDON,H.S.(1974):Arch.Biochem.Biophys.163:429-431.
- KOHLAW,G.,DRAGERT,W. and HOLZER,H.(1965):Biochem.341:224-
238.
- KRETOVICH,W.L.,TKEMALADZE,G.S.,KARYAKINA,T.J.,ROMANOVA,E.A.
and SIDELNIKOVA,L.I.(1970):Dokl.Akad.
Nauk.SSSR.190:222-224.
- KRETOVICH,V.L.,KARYAKINA,T.J.,and TKEMALADZE,G.S.(1972):
Dokl.Akad.Nauk.SSSR.202:225-228.



- KRETOVICH, V.L., KARYAKINA, T.J., SIDELNIKOVA, L.I. and KALOSHINA, G.C. (1971) : Dokl. Akad. Nauk. SSSR. 201: 1252-1254.
- KRETOVICH, V.L., KARYAKINA, T.J., SIDELNIKOVA, L.I. (1973) : Dokl. Akad. Nauk. SSSR. 208: 457-459.
- KRETOVICH, V.L., KARYAKINA, T.J., SIDELNIKOVA, L.I. and YAZYKOVA, V.V. (1973) : Dokl. Akad. Nauk. SSSR. 213: 571-573.
- LAYNE, E. (1957) : In "Methods in Enzymology". COLOWICK, S.P. and KAPLAN, N.O. eds. Academic Press. New York. vol 2: 447-454.
- LEA, P.J. and FOWDEN, L. (1975) : Proc. R. Soc. London. B. 192: 13-26.
- LEA, P.J. and MIFLIN, B.J. (1974) : Nature. 251: 614-616.
- LEA, P.J. and MIFLIN, B.J. (1975) : Biochem. Soc. Trans. 3: 381-384.
- LEA, P.J. and MIFLIN, B.J. (1975) : Biochem. Biophys. Res. Commun. 64: 856-862.
- LEA, P.J. and NORRIS, J. (1976) : Phytochem. 15: 585-595.
- LEA, P.J. and THURMAN, D.A. (1972) : J. Exp. Bot. 23: 440-449.
- LEECH, R.M. and KIRK, P.R. (1968) : Biochem. Biophys. Res. Commun. 32: 685-690.
- LEWIS, O.A.M. (1975) : J. Exp. Bot. 26: 361-372.
- LEWIS, O.A.M. and BERRY, M.J. (1975) : Planta. 125: 77-80.
- LEWIS, O.A.M. and PATE, J.S. (1973) : J. Exp. Bot. 24: 596-606.
- LEWIS, O.A.M., WAISER, J.J. and PROBYN, T.A. (1979) : In "Nitrogen assimilation in plants". HEWITT, E.J. and CUTTING, C.V. eds. Academic Press. New York. 435-440.

- LIGNOWSKI, E.M., SPLITSTOESSER, W.E. and CHOU, K. (1971): Plant Cell Physiol. 12:733-738.
- MACPARLAND, R.H., GUEVARA, J.G., BECKER, R.R. and EVANS, H.J. (1976): Biochem. J. 153:597-606.
- MAGALHAES, A.C., NEYRA, C.A. and HAGEMAN, R.H. (1974): Plant Physiol. 53:411-415.
- MARWAHA, R.S. and JULIANO, B.O. (1976): Plant Physiol. 57:923-927.
- MCKENZIE, G.H., CHNG, A.L. and GAYLER, L. (1979): Plant Physiol. 63:573-582.
- MEERS, J.L., TEMPEST, D.W. and BROWN, C.W. (1970): J. Gen. Microbiol. 64:187
- MEISTER, A. (1974): In "The enzymes". BOYER, E.D. ed. Academic, New York 699-754.
- MIFLIN, B.J. (1977): In "Regulation of enzyme synthesis and activity" SMITH, H. ed. London: Academic.
- MIFLIN, B.J. and LEA, P.J. (1975): Biochem. J. 149:403-409.
- MIFLIN, B.J. and LEA, P.J. (1976): Phytochem. J. 15:873-885.
- MIFLIN, B.J. and LEA, P.J. (1976): Trends Biochem. Sci. 1:103-106.
- MIFLIN, B.J. and LEA, P.J. (1977): Ann. Rev. Plant Physiol. 28: 229-329.
- MILLER, R.E. (1973): In "The enzymes of glutamine metabolism". PRUSINER, S. and STADTMAN, E.R. eds. Academic Press. New York. 183-205.
- MITCHELL, C.A. and STOCKING, C.R. (1975): Plant Physiol. 55:59-63.
- MOHANTY, S. and FLETCHER, J.S. (1978): Plant Physiol. 43:221-225.

- MOHANTY, S. and FLETCHER, J.S. (1980): Plant Physiol. 48:453-459.
- MOORE, R. and CLANTON, C.B. (1979): Plant Physiol. 64:309-313.
- MOORE, A.L. and WILSON, S.B. (1977): J. Exp. Bot. 28:607-618.
- MUHAMMAD, S. and KUMAZAWA, K. (1974): Plant Cell Physiol. 15:
759-766.
- MUHAMMAD, S. and KUMAZAWA, K. (1974): Plant Cell Physiol. 15:
747-758.
- NAUEN, W. and HARTMANN, T. (1980): Planta 148:7-16.
- NAYLOR, A. and TOLBERT, N.E. (1956): Physiol. Plant. 9:220-229.
- NEYRA, C.A. and HAGEMAN, R.H. (1976): Ibid. 58:731-735.
- NICKLISCH, A., GESKE, W. and KOHL, J.G. (1976): Biochem. Physiol.
Pflanz. 170:85-90.
- OAKS, A., JONES, K. and MISRA, S. (1979): Plant Physiol. 63:793-795.
- OGHOGHORIE, C.G.O. and PATE, J.S. (1972): Planta 104:35-49.
- OJI, Y. and IZAWA, G. (1971): Plant Cell Physiol. 12:817-821.
- OJI, Y. and IZAWA, G. (1974): J. Sci. Soil Manure (Japan) 45:341-351.
- O'NEAL, D. and JOY, K.W. (1973): Arch. Biochem. Biophys. 159:113-122.
- O'NEAL, D. and JOY, K.W. (1974): Plant Physiol. 54:773-779.
- O'NEAL, D. and JOY, K.W. (1975): Plant Physiol. 55:968-974.
- PAHLICH, E. and HOFFMAN, J. (1975): Planta 122:185-203.
- PAHLICH, E. and JOY, K.W. (1971): Can. J. Biochem. 49: 127-138

- PAMILJANS, V., KRISENASWAMY, R., DUMVILLE, G. and MEISTER, R.A.
(1962): Biochem. 1: 153-158.
- PATE, J.S. (1973): Soil Biol. Biochem. 5: 109-119.
- PATEMAN, J.A. (1970): Biochem. J. 115: 769-775.
- PISTORIUS, E.K., GEWITZ, H.S., VOSS, H. and VENNESLAND, B. (1976):
Planta 128: 73-80.
- POSTIUS, C. and JACOBI, G. (1976): Z. Pflanzenphysiol. 78: 133-140.
- RADIN, J.W. (1973): Plant Physiol. 51: 322-336.
- RATHMAN, C.K.M. and EDWARDS, G.E. (1976): Plant Physiol. 57:
881-883.
- RAVEL, J.M., HUMPHREYS, J.S. and SHIVE, W. (1965): Arch. Biochem.
111: 720-726.
- RAVEN, J.A. and SMITH, F.A. (1976): New Phytol. 76: 415-418.
- REBELLO, J.L., and STRAUSS, N. (1969): J. Bacteriol. 98: 683-588.
- RITENOIR, G.L., JOY, K.W., BLUNNING, J. and HAGEMAN, R.H. (1967):
Plant Physiol. 42: 233-237.
- RHODES, D., RENDON, G.A. and STEWART, G.R. (1976): Planta (Berl).
129. 203-210.
- RHODES, D., SIMS, A.P. and STEWART, G.R. (1979): In "Nitrogen assi
milation in plants". HEWITT, E.J. and CU-
TTING, C.V. eds Academic Press. New York.
501-520.
- ROBERTSON, J.G., WARBURTON, M.P. and FARNDEN, K.J. (1975). Febs.
Letts. 55: 33-37.
- ROGNES, S.E. (1975): Phytochem. 14: 1975-1977.
- ROON, R.J., EVEN, H.L. and LARIMORE, F. (1974): J. Bacteriol.
118: 89-93.

- SAIRAM,R.K.,SIROHI,G.S. and SRIVASTAVA,G.C.(1975):Plant --
Physiol.35:126-128.
- SARKISSIAN,G.S. and FOWLER,M.W.(1974):Planta 119:335-349.
- SAWHNEY,S.K.,NAIK,M.S.and NICHOLAS,D.J.D.(1978):Biochem.
Biophys.Res.Comun.81:1209-1216.
- SCHRADER,L.E.(1977):In "Nitrogen in the enviroment".NIELSEN,
D.R. and MACDONALD,J.G.eds.Academic Press.
New York.
- SEGAL,A. and STADTMAN,E.R.(1972):Arch.Biochem.Biophys.152:
367-377.
- SENIOR,P.J.(1975):J.Bacteriol.123:407-418.
- SHAPIRO,B.M. and STADTMAN,E.R.(1970):Ann.Rev.Microbiol.
24:501-524.
- SHEPARD,D.V. and THURMAN,D.A.(1973):Phytochem.12:1937-1945.
- SIHAG,R.K.,MUKHERJEE,S.G. and SOPORY,S.K.(1979):Plant Physiol.
45:281-287.
- SIMS,A.P.,FOLKES,B.F. and BUSSEY,A.H.(1968):In "Recent as-
pects of nitrogen metabolism in plants".
HEWITT, E.J. and CUTTING,C.V.eds.Academic
Press.London.91-114.
- SKOKUT,J.A.,WOLK,C.P.,THOMAS,J.,MEEKS,J.C.,SHAFFER,P.W. and
CHIEN,W.S.(1978):Plant Physiol.62:299-304.
- SODEK,L., and DA SILVA,W.J.(1979):In "Nitrogen assimilation
in plants". HEWITT,E.J. and CUTTING,C.V.
eds.Academic Press.New York.441-444.
- SOULEN,T.K. and OLSON,L.C.(1969):Planta 56:205-208.

- STADTMAN, E.R. and GINSBURG, G. (1974) : In "The enzymes". BOYER
P.D. ed. New York Academic. 16:755-808.
- STEVENSON, G.R. and LEJÖHN, H. (1971) : J. Biol. Chem. 246:2127-
2135.
- STEWART, G.R. and RHODES, D. (1976) : Febs. Setts. 64:296-198.
- STEWART, G.R. and RHODES, D. (1977) : New Phytol. 79:257-268.
- STEWART, G.R. and RHODES, D. (1978) : New Phytol. 80:307-316.
- STEWART, G.R. and ROWELL, J. (1975) : Biochem. Biophys. Res. Commun.
65:846-856.
- STONE, S.R., HEYDE, E. and LES COPELAND (1980) : Arch. Biochem.
Biophys. 199:550-559.
- STONE, S.R., HEYDE, E. and LES COPELAND (1980) : Arch. Biochem.
Biophys. 199:560-571.
- STOREY, R. and BEEVERS, L. (1976) : Plant Physiol. Suppl. 57:
204-208.
- STOREY, R. and REPORTER, M. (1978) : Can. J. Bot. 56:1349-1356..
- STREETER, J.G. (1973) : Arch. Biochem. Biophys. 157:613-624.
- TEMPEST, D.W., MEERS, E.J. and BROWN, C.M. (1970) : Biochem.
J. 117:405-407.
- TEMPEST, D.W., MEERS, E.J. and BROWN, C.M. (1973) : In "The enzy-
mes of glutamine metabolism". PRUSINER, S.
and STADTMAN, E.R. eds. Academic Press.
New York. 167-182.
- TINKER, P.B.H. (1979) : In "Nitrogen assimilation in plants".
HEWITT, E.J. and CUTTING, C.V. eds. Academic
Press. New York. 101-122

THOMAS, J., WOLK, C.P., SHAFFER, P.W., AUSTIN, S.M. and GALONSKY, A.
(1975): Biochem. Biophys. Res. Commun. 67:
501-507.

THURMAN, D.A., PALIN, C. and LAYCOCK, M.V. (1965): Nature. 207:
193-194.

TRAVIS, R.L., JORDAN, W.R. and HUFFAKER, R.C. (1970): Plant Physiol. 23:678-685.

VANKOVA, R.A., SHATILOV, V.R., AMBARTISUMYAN, V.G. and KRETOVICH,
V.L. (1973): Dokl. Akad. Nauk. SSSR. 210:
228-231.

VARNER, J.E. (1960): Arch. Biochem. Biophys. 90:7-11.

VARNER, J.E. and WEBSTER, G.L. (1960): Plant Physiol. 30:393-402.

VEECH, R.L. (1978): In "Microenvironments and metabolic compartmentation". SRERE, P.A. and ESTABROOK, R.W. eds. Academic Press. New York. 17-61.

VELICHY, I.A. and ROSE, D. (1973): Can. J. Bot. 51:1837-1844.

VERONESE, F.M., BOCCU, E. and CONVENTI, L. (1975): Biochim. Biophys. Acta. 377:217-228.

WALLACE, W. (1973): Plant Physiol. 52:191-196.

WALLSGROVE, R.M., HARE, L.E., LEA, P.J. and MIFLIN, B.J. (1977): J. Exp. Bot. 28:588-96.

WALLGROVES, R.M., LEA, P.J. and MIFLIN, B.J. (1979): Plant Physiol. 63: 232-236.

WARBUNG, D. and CHRISTIAN, W. (1942): Biochem. 2:384-421.

WARNKE, D.D. and BARBER, S.A. (1974): J. Environ. Qual. 3:28-30.

- WEBSTER,G.(1964):In "Modern methods of plant analysis".
LINSKENS,H. and SANWAL,B. and TRACEY,M.
eds.Springer-Verlag.Berlin VII:393-420.
- WESSMAN,G.S.(1972):Plant Physiol.49:138-141.
- WELANDER,M.(1974):Plant Physiol.30:192-199.
- WETHEREL,D.F. and DOUGALL,D.K.(1976):Plant Physiol.37:97-103.
- WOLK,C.P.,THOMAS,S.J.,SHAFFER,P.W.,AUSTIN,S.M. and GALONSKY
A.(1976):J.Biol.Chem.251:5027-5034.
- YAKOLEVA,V.L.,KRETOVICH,V.C. and GORETOV,V.P.(1966):
Biokhimiya.31:887-891.
- YAMASAKI,K. and SUZUKI,Y.(1969):Phytochem.8:963-966.
- YONEYAMA,T. and KUMAZAWA,K.(1974):Plant Cell Physiol.
15:574-581.
- YONEYAMA,T. and KUMAZAWA,K.(1975):Plant Cell Physiol.
16:21-26.
- YUE,S.B.(1969):Plant Physiol. 44:453-457.

